

이학석사 학위논문

갈조류 지충이 (*Sargassum thunbergii*)로부터
항산화 물질의 분리와 동정

Isolation and Identification of Antioxidant Constituents
from the Brown Alga *Sargassum thunbergii*

지도교수 서 영 완

2005년 2월

한 국 해 양 대 학 교 대 학 원

해양생명환경학과

박 기 의

이학석사 학위논문

갈조류 지충이 (*Sargassum thunbergii*)로부터
항산화 물질의 분리와 동정

Isolation and Identification of Antioxidant Constituents
from the Brown Alga *Sargassum thunbergii*

지도교수 서 영 완

2005년 2월

한 국 해 양 대 학 교 대 학 원

해양생명환경학과

박 기 의

본 논문을 박기희의 이학석사 학위논문으로 인준함.

2004년 12월

위원장 농학박사 안 종 응



위 원 이학박사 임 선 영



위 원 이학박사 서 영 완



한국해양대학교 대학원

목 차

	Page
List of schemes -----	i
List of tables -----	ii
List of figures -----	iii
Abbreviations -----	vi
List of symbols -----	vii
Abstract -----	1
1 서론 -----	4
2 실험 방법 -----	8
2-1. 재료 -----	8
2-2. 시약 -----	9
2-3. 기기 -----	9
2-4. 추출, 분획 및 분리 -----	10
(1) 추출 및 분획 -----	10
(2) 지층이의 활성 성분 분리 -----	12
2-5. 항산화 활성 실험 -----	20
(1) DPPH radical 소거 활성 -----	20
(2) Peroxynitrire 소거 활성 -----	23

3. 결과 및 고찰	26
3-1. 지층이에서 분리된 화합물들의 구조결정	26
3-2. 항산화 활성	60
(1) DPPH radical 소거 활성	60
1) 지층이의 분획별 활성	60
2) Compounds 1-5 의 활성	62
(2) Peroxynitrite 소거 활성	64
1) 지층이의 분획별 활성	64
2) Compounds 1-5 의 활성	66
4. 요약 및 결론	69
5. 참고문헌	71
감사의 글	75

List of schemes

	Page
Scheme 1. Procedure of extraction and various fractions from <i>Sargassum thunbergii</i> . -----	11
Scheme 2. Isolation of compounds 1-8 from <i>Sargassum thunbergii</i> . -----	13
Scheme 3. Measurement of DPPH radical scavenging effect. -----	22
Scheme 4. Measurement of the ONOO ⁻ scavenging activity. -----	25

List of tables

	Page
Table 1. NMR spectral assignments for compounds 4 and 5^a -----	18
Table 2. ¹³ C NMR spectral assignments for compounds 1-5^a -----	19
Table 3. DPPH radical scavenging effect of <i>Sargassum thunbergii</i> compounds 1-5 -----	63
Table 4. Scavenging activity of <i>Sargassum thunbergii</i> fractions on ONOO ⁻ from decomposition of SIN-1 (50 µg/ml) -----	64
Table 5. Scavenging activity of <i>Sargassum thunbergii</i> compounds 1-5 on authentic ONOO ⁻ and ONOO ⁻ from decomposition of SIN-1 (12.5 µg/ml) -----	67

List of figures

	Page
Fig. 1. Photograph of <i>Sargassum thunbergii</i> . -----	8
Fig. 2. Scavenging of the DPPH radical by phenol (Blois, 1958).-----	21
Fig. 3. Peroxynitrite (ONOO ⁻) mediated oxidation of DHR123. -----	24
Fig. 4. ¹ H NMR spectrum of compound 1 in CDCl ₃ . -----	27
Fig. 5. ¹³ C NMR spectrum of compound 1 in CDCl ₃ . -----	27
Fig. 6. gDQCOSY spectrum of compound 1 in CDCl ₃ . -----	28
Fig. 7. TOCSY spectrum of compound 1 in CDCl ₃ . -----	28
Fig. 8. DEPT spectrum of compound 1 in CDCl ₃ . -----	29
Fig. 9. HSQC spectrum of compound 1 in CDCl ₃ . -----	29
Fig. 10. gHMBC spectrum of compound 1 in CDCl ₃ . -----	30
Fig. 11. ¹ H NMR spectrum of compound 2 in CDCl ₃ . -----	31
Fig. 12. ¹³ C NMR spectrum of compound 2 in CDCl ₃ . -----	31
Fig. 13. gDQCOSY spectrum of compound 2 in CDCl ₃ . -----	32
Fig. 14. TOCSY spectrum of compound 2 in CDCl ₃ . -----	32
Fig. 15. DEPT spectrum of compound 2 in CDCl ₃ . -----	33
Fig. 16. HMQC spectrum of compound 2 in CDCl ₃ . -----	33
Fig. 17. gHMBC spectrum of compound 2 in CDCl ₃ . -----	34
Fig. 18. ¹ H NMR spectrum of compound 3 in CDCl ₃ . -----	36
Fig. 19. ¹³ C NMR spectrum of compound 3 in CDCl ₃ . -----	36
Fig. 20. gDQCOSY spectrum of compound 3 in CDCl ₃ . -----	37
Fig. 21. TOCSY spectrum of compound 3 in CDCl ₃ . -----	37
Fig. 22. DEPT spectrum of compound 3 in CDCl ₃ . -----	38
Fig. 23. HSQC spectrum of compound 3 in CDCl ₃ . -----	38
Fig. 24. gHMBC spectrum of compound 3 in CDCl ₃ . -----	39
Fig. 25. ¹ H NMR spectrum of compound 4 in CDCl ₃ . -----	41
Fig. 26. ¹³ C NMR spectrum of compound 4 in CDCl ₃ . -----	41
Fig. 27. gDQCOSY spectrum of compound 4 in CDCl ₃ . -----	42
Fig. 28. TOCSY spectrum of compound 4 in CDCl ₃ . -----	42

Fig. 29. DEPT spectrum of compound 4 in CDCl ₃ . -----	43
Fig. 30. HMQC spectrum of compound 4 in CDCl ₃ . -----	43
Fig. 31. gHMBC spectrum of compound 4 in CDCl ₃ . -----	44
Fig. 32. ¹ H NMR spectrum of compound 5 in CDCl ₃ . -----	46
Fig. 33. ¹³ C NMR spectrum of compound 5 in CDCl ₃ . -----	46
Fig. 34. gDQCOSY spectrum of compound 5 in CDCl ₃ .-----	47
Fig. 35. TOCSY spectrum of compound 5 in CDCl ₃ . -----	47
Fig. 36. DEPT spectrum of compound 5 in CDCl ₃ . -----	48
Fig. 37. HSQC spectrum of compound 5 in CDCl ₃ . -----	48
Fig. 38. gHMBC spectrum of compound 5 in CDCl ₃ . -----	49
Fig. 39. Key NOESY correlations for compound 5 . -----	49
Fig. 40. Chemical structure of compounds 1-5 . -----	50
Fig. 41. ¹ H NMR spectrum of compound 6 in CD ₃ OD.-----	53
Fig. 42. ¹³ C NMR spectrum of compound 6 in CD ₃ OD.-----	53
Fig. 43. gDQCOSY spectrum of compound 6 in CD ₃ OD.-----	54
Fig. 44. gHMBC spectrum of compound 6 in CD ₃ OD. -----	54
Fig. 45. NOESY correlation of key protons for compound 6 . -----	55
Fig. 46. NOESY correlation of key protons for compound 7 . -----	55
Fig. 47. ¹ H NMR spectrum of compound 8 in CD ₃ OD. -----	57
Fig. 48. ¹³ C NMR spectrum of compound 8 in CD ₃ OD. -----	57
Fig. 49. gDQCOSY spectrum of compound 8 in CD ₃ OD. -----	58
Fig. 50. gHMBC spectrum of compound 8 in CD ₃ OD. -----	58
Fig. 51. Chemical structure of compounds 6 - 8 . -----	59
Fig. 52. DPPH radical scavenging effect of <i>Sargassum thunbergii</i> fractions (100 µg/ml). -----	61
Fig. 53. DPPH radical scavenging effect of <i>Sargassum thunbergii</i> compounds 1-5 . -----	62
Fig. 54. Scavenging activity of <i>Sargassum thunbergii</i> fractions on authentic ONOO ⁻ (50 µg/ml). -----	65

Fig. 55. Scavenging activity of *Sargassum thunbergii* compounds **1-5** on authentic ONOO⁻ (12.5 µg/ml). ----- 68

Fig. 56. Scavenging activity of *Sargassum thunbergii* compounds **1-5** on ONOO⁻ from decomposition of SIN-1 (12.5 µg/ml). ----- 68

List of abbreviations

BHA	: butylated hydroxyanisole
BHT	: butylated hydroxytoluene
c	: concentration
CD ₃ OD	: deuterium methanol
CH ₂ Cl ₂	: dichloromethane (methylene chloride)
¹³ C NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
COSY	: homonuclear correlation spectroscopy
DEPT	: distortionless enhancement by polarization transfer
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EtOAc	: ethyl acetate
Fig.	: figure
H ₂ O	: water
¹ H NMR	: proton nuclear magnetic resonance
HMBC	: heteronuclear multiple-bond connectivity
HMQC	: heteronuclear multiple-quantum connectivity
HRFAB	: high resolution fast atom bombardment
Hz	: herz(sec ⁻¹)
IC ₅₀	: 50% inhibitory concentration
IR	: Infrared
LRFAB	: low resolution fast atom bombardment
MeOH	: methanol
MS	: mass spectroscopy
<i>n</i> -BuOH	: normal-butanol
NO•	: nitric oxide radical
NOESY	: nuclear overhauser enhancement spectroscopy
•O ₂ ⁻	: superoxide anion radical
•OH	: hydroxyl radical
ONOO ⁻	: peroxynitrite
RNS	: reactive nitrogen species
ROS	: reactive oxygen species
RP	: reverse phase
S	: substrate
SiO ₂	: silica gel
TLC	: thin layer chromatography
UV	: ultraviolet
<i>v</i> _{max}	: maximal velocity

List of symbols

J	Coupling constant (Hz)
M^+	Molecular ion
m/z	Mass to charge
R_f	Rate of flow
δ	Chemical shift

Isolation and Identification of Antioxidant Constituents from the Brown Alga *Sargassum thunbergii*

Ki Eui Park

*Division of Ocean Science, Korea Maritime University, Busan,
606-791, Korea*

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide, singlet oxygen, superoxide anion radical, hydroxy radical, alkoxy radical, and peroxy radical from the autoxidation process of lipids as well as reactive nitrogen species (RNS) such as peroxynitrite are generated under normal and/or pathological conditions. ROS and RNS are likely to damage several cellular components such as lipids, proteins, nucleic acids, and DNAs through oxidation and nitration process. In addition, these reactive species cause inflammation or lesions on various organs and are associated with various degenerative diseases.

As part of our search for novel antioxidant compounds from marine organisms, we have collected the brown alga *Sargassum thunbergii*

along the shore of Busan, which is widely distributed in the southern coastal area of the Korean Peninsula. The collected samples of *Sargassum thunbergii* were briefly dried under shade and repeatedly extracted for 2 days with a mixture (1:1) of acetone-CH₂Cl₂ (1.5 L X 2) and MeOH (1.5 L X 2), respectively. The combined crude extracts of *Sargassum thunbergii* were fractionated into *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, and water fractions.

The antioxidant activities of *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, and water fractions including crude extracts of *Sargassum thunbergii* were evaluated using 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radical, authentic ONOO⁻, and ONOO⁻ generated from SIN-1. Scavenging activities of the individual fractions on DPPH increased in the order of 85% aq. MeOH > *n*-BuOH > H₂O > *n*-hexane, showing 91.9, 50.0, 34.8, and 9.4% in their scavenging ratios at a concentration of 100 µg/ml, respectively. The scavenging activities of these four fractions on authentic ONOO⁻ increased in the order of 85% aq. MeOH > *n*-BuOH > *n*-hexane > H₂O fractions and were 96.3, 63.5, 45.6, and 41.1% in their scavenging ratios, respectively, at concentration of 50 µg/ml.

On the basis of the results, Further purification of the 85% aq. MeOH fraction with significant scavenging activity on DPPH and authentic ONOO⁻ using C₁₈ reversed-phase column, followed by HPLC, resulted in the isolation of compounds **1-8**. In our measurement for evaluating antioxidant effect of compounds **1-5** using DPPH radical, they exhibited significantly high activities with IC₅₀ value of 26, 27, 25, 30, and 31 µg/ml, respectively, compared with BHT (IC₅₀, 32 µg/ml) and L-ascorbic acid (IC₅₀, 11.4 µg/ml). Also, in our measurement for the

scavenging/inhibitory activity of compounds **1-5** on authentic/induced ONOO⁻ from SIN-1, the scavenging activities of compounds **1-5** on authentic ONOO⁻ increased in the order of **1** > **3** > **5** > **4** > **2**, with scavenging ratios of 90.3, 88.1, 60.0, 57.1, and 50.6% at 12.5 $\mu\text{g/ml}$ respectively. However, inhibitory activities against the generation of ONOO⁻ from SIN-1 differed, **5** > **2** > **4** > **1** > **3** > at 98.6, 95.8, 90.6, 85.8, and 76.6% in their scavenging ratios, respectively. Scavenging/inhibitory activities of L-ascorbic acid and penicillamine, positive controls, on authentic/induced ONOO⁻ were 98.1 and 90.4%, and 93.5 and 88.2%, respectively. These results suggest that the antioxidative activity in the crude extract of *Sargassum thunbergii* was partially attributable to these compounds **1-5**.

1. 서론

과거로부터 현재까지 천연물로부터 생리활성 물질을 추출하여 일상생활에 적용시키고자하는 노력이 꾸준히 계속되고 있다. 이러한 노력은 육상자원이 점차 고갈되어 감에 따라 지구의 70% 이상을 차지하고 있는 무한한 자원의 보고인 해양자원에 눈을 돌리게 되었다. 해양에는 갑각류, 어류, 조개류, 해조류 등 다양한 생물이 서식할 뿐만 아니라 해수로 덮여있는 바다의 환경은 육상과는 전혀 다른 환경을 가지고 있어 그 생물들의 대사체계가 육상생물과 상당히 달라 지금까지 알려진 육상생물의 이차 대사물질과는 대단히 다른 형태의 화합물을 함유하고 있을 가능성이 매우 높다고 할 수 있다. 지난 수십 년간 걸친 해양천연물에 대한 연구는 육상생물에서는 알려지지 않았던 새로운 화합물이 존재한다는 것을 알려주었고, 이들 중 많은 화합물이 항암성, 항바이러스성, 항균성 및 기타 우수한 생리활성을 가진 것으로 나타났다. 병원균이나 바이러스에 대한 성장 억제 물질, 생물의 생리 기능이나 생태계의 제어에 관계되는 약리 활성 물질, 세포 독성이나 항종양 활성 물질 및 유독 물질 등의 새로운 생리 활성 물질들이 해양 생물로부터 발견되고 있다 (Scheuer 1987-1990; Hoppe 1979).

이러한 해양생물들 중에 해조류는 풍부한 미네랄과 비타민, 탄수화물, 단백질을 함유하고 있어 고대로부터 식용으로 이용되어 왔으며, 최근에는 일본에서 젤, 치즈, 와인, 차, 스프, 라면 등에 이용하고 있으며, 유럽에서는 agar, alginates, carrageenan과 같은 해조류 다당류를 식품이나 약제의 원료로 사용하고 있다 (Ruperez 2002; Sanchez-Machado 2003). 아시아 지역에서는 해조추출물을 해열제나 의상 통풍, 담석증, 고혈압, 설사, 화상, 위궤양 등의 다양한 질환의 치료제로 사용되어 왔다 (Kelasay *et al.*, 1981; Sosulski and Cadden, 1982; Trowell, 1992).

이와 같이 우리에게 매우 친숙한 해조류는 다양한 응용성이 있음에도 불구하고

하고 주로 인간의 식량으로만 사용되어 왔으며 국내에서도 해조류의 기능성 성분을 이용하여 고부가가치 산물을 얻으려는 노력이 간헐적으로 시도되었으나 거의 대부분의 연구가 해조류의 유기 추출물을 이용하여 생리활성을 스크리닝하는 정도에서 끝났으며 그 속에 함유된 화학성분을 분리 동정하려는 노력이 매우 미흡한 실정이었다. 따라서 본 연구에서는 이러한 해조 추출물을 대상으로 인간의 노화와 매우 밀접한 관련이 있는 활성 산소종과 활성 질소종을 소거시키는 항산화 효과를 탐색하고 항산화 물질을 분리 정제하여 그 구조를 결정하고자 하였다.

활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)과 활성 질소종 (reactive nitrogen species, RNS)에 의한 손상으로 인한 노화 진행은 신체 노화와 관련된 퇴행성 질환의 원인들 중 가장 합리적인 이론으로 알려져 있다. ROS와 RNS들은 정상적인 세포 대사 과정 중 지속적으로 파괴되고, 50% 이상의 과도한 양은 생체 내 분자들을 손상시키고, 세포 기능 저하와 세포사를 일으켜 결국은 유기체 전체의 기능 쇠퇴와 함께 퇴행성 변화를 일으켜 인간을 죽음으로 이르게 한다. 세포내 미토콘드리아에서 산소 호흡을 할 때 전자 하나를 받아 생성된 superoxide anion ($\cdot O_2^-$)은 반응성이 비교적 낮으나 NOS (nitric oxide synthetase)에 의해 L-arginine을 기질로 하여 만들어진 nitric oxide (NO)는 반응성이 크고 반감기가 아주 짧은 특징을 갖는 활성산소이다. NO는 세포막을 쉽게 확산하여 다른 활성산소들과 반응할 수 있으며, 특히 $\cdot O_2^-$ 와 결합하여 반응성이 매우 큰 peroxynitrite anion ($ONOO^-$)을 생성한다 (Pryor, 1995; Reiter *et al.*, 2002). Nitric oxide는 과잉생성 시 신경퇴행성 질환, 만성염증, 폐혈증, 고혈압, 혈전증, 신부전증, ARDS (adult respiratory distress syndrome; 성인호흡곤란 증후군), AIDS (acquired immunodeficiency syndrome; 후천성 면역 결핍증)에 의한 뇌장애, 기관지 경련, 발작 등을 야기시킨다 (Moncada *et al.*, 1991). 최근에 많은 연구가 되고 있는 peroxynitrite는 NO와 유사한 생리작용을 가지며, 지질, 단백질, DNA를

공격하여 hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)과 마찬가지로 많은 산화적 손상을 진행시킨다. 그러므로 발암 및 세포독성을 지니는 합성 항산화제를 대체할 적절한 천연 항산화제의 개발은 생체 내 prooxidant/antioxidant의 적절한 균형을 이루는데 기여함으로써 다양한 질환을 예방하며 적절한 노화현상을 유지시키는데 기여할 것이다. 여기에서 새로운 항산화제를 검색하는 수단으로 in vitro 상에서 superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$)과 nitric oxide ($\text{NO}\cdot$)를 동시에 발생시키는 3-morpholinsydnonimine (SIN-1)와 authentic peroxyxynitrite (ONOO^-) 그리고 안정한 free radical로 알려져 있는 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)을 이용하여 항산화물질을 탐색하였다.

부산 및 제주도 연안에서 채집한 30여종의 해조시료에 대한 항산화 활성 스크리닝을 실시하였으며 그 중에 갈조류의 모자반속 (*Sargassum*)에 속하는 지충이 (*Sargassum thunbergii*)의 추출물이 좋은 활성을 보일 뿐만 아니라 채집한 양도 상당하여 이 해조시료를 중점연구대상 생물로 선정하였다. 갈조류의 모자반속 (*Sargassum*)은 난해(暖海)성 식물로 다년생이며 연안에서 해중립을 이루는 대표적인 종류이다. 바닷가 간조선 이하 암석지에 많이 분포하며 모자반 속이 번무하는 곳은 각종 연안동물 등이 먹이를 얻거나 산란하기에 적합하여, 환경보존과 어업자원 확보를 위해서도 매우 중요한 구실을 한다. 모자반 속의 많은 종류가 식용되기도 하며, 알긴산 등 해조 공업의 원료로 이용되거나 비료로도 쓰인다. 지충이 외에 우리나라에 서식하는 모자반속의 다른 예로는 짝잎모자반 (*Sargassum hemiphyllum*), 알송이 모자반 (*Sargassum confusum*), 파배기모자반 (*Sargassum siliquastrum*), 팽생이모자반 (*Sargassum hornerii*), 큰잎모자반 (*Sargassum coreanum*) 등이 있다.

갈조류 (Phaeophyta) 모자반과 (Sargassaceae)에 속하는 지충이 (*Sargassum thunbergii*)는 우리나라 전 연안에서 흔히 볼 수 있는 해조류로서 조간대 하부에서 뚜렷한 군락을 이루고 있다. 어린 식물은 흔히 사료로 사용되고 있으나 크게 주목받지 못하고 있던 해조류로서 이 생물에 대한 화학적

인 연구는 매우 드물어 이 등에 의한 지층이를 이용한 중금속의 흡착제를 개발 (Lee *et al.*, 2000), 2종류의 glyceroglycolipids 분리 (Kim *et al.*, 1992), 추출물 분획에 대한 약간의 생리활성도에 대한 보고가 거의 전부이다 (Amano *et al.*, 1993; Hirota *et al.*, 1994).

2. 실험 방법

2-1. 재료

실험에 사용한 지충이 (*Sargassum thunbergii*) 는 2002년 10월 부산 기장에서 직접 채집하였으며 응달에서 건조한 후 추출하기 전까지 -25 ℃에서 보관하였다가 추출할 때는 잘게 잘라서 사용하였다 (Fig. 1).



Fig. 1. Photograph of *Sargassum thunbergii*.

2-2. 시약

Column packing materials 은 RP 18 (YMC-GEL ODS-A, 12 nm, S-75 μm)을 사용하였으며, TLC plate는 RP 18 F254s (Merck)와 Silica gel 60 F254, 0.5 mm (Merck)를 사용하였으며, spray reagent는 5% H_2SO_4 를 분사하여 발색되는 것을 관찰하였다. 추출 및 분획, column chromatography에 사용한 모든 용매는 1급 시약을 구입하여 사용하였다. Varian RI detector와 high performed liquid chromatography (HPLC, Dionex P580)를 사용하여 정제·분리하였다. 사용한 HPLC column은 YMC pack ODS-A (250×10 mm, S 5 μm , 12 mm)을 사용하였고, guard column (7.5×4.6 mm, Alltech)을 사용하였다. NMR 측정 시 사용한 용매는 CDCl_3 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA, deuterium degree 99.8%), CD_3OD (Merck, deuterium degree 99.95%)를 사용하였다.

DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical), 3-morpholinsydnonimine (SIN-1)과 dihydrorhodamine 123 (DHR 123), penicillamine (DL-2-amino-3-mercapto-3-methylbutanoic acid) 은 Sigma사 (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그리고 peroxyxynitrite (ONOO^-)는 Cayman (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 항산화 실험에 사용하였다.

2-3. 기기

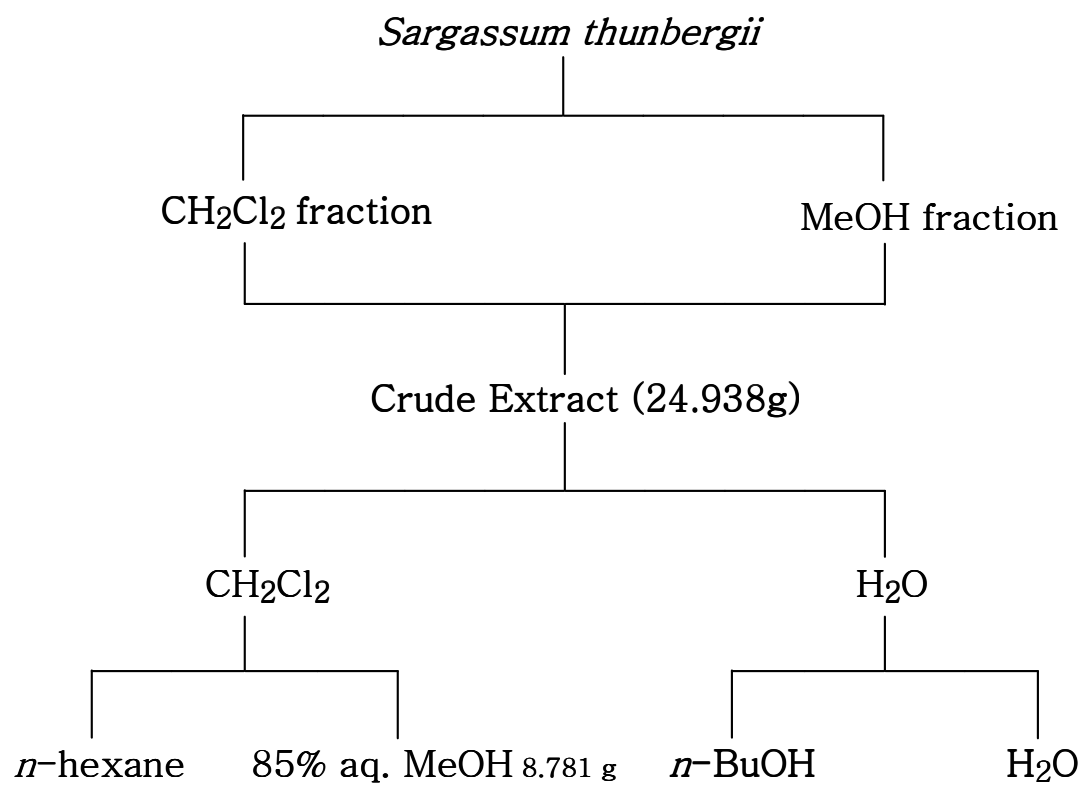
^1H -NMR과 ^{13}C -NMR, two-dimension NMR 모두 Varian NMR 300 spectrometer를 사용하였다. 선광도는 polarimeter (ATAGO, POLAX-2L)를 사용하여 측정하였다.

UV-Vis 분광도는 Shimazu사의 UV 1201로 측정하였다.

2-4. 추출, 분획 및 분리

(1) 추출 및 분획

채집한 지충이 (*Sargassum tunbergii*)는 사용하기 전에 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 냉동고에 보관하였다가 해빙하여 짧게 자른 후에 먼저 acetone과 methylene chloride를 1:1 비율로 혼합하여 지충이가 충분히 잠기도록 하여 24시간 방치한 후 여과하였다. 이 과정을 2회 반복하여 얻은 여액은 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator (EYELA JAPAN, N-N series)로 농축하여 acetone/methylene chloride 추출물 11.721 g 을 얻었다. 남은 잔사에 동량의 methanol을 부어 위와 동일한 과정을 2회 반복하여 methanol 추출물 13.217 g 을 얻었다. acetone/methylene chloride 추출물과 methanol 추출물의 농축액의 약 1 g은 생리활성 test를 하기 위해 vial에 담아 냉동고에 보관하였고, 나머지 조추출물 24.938 g 은 모두 혼합하여 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H₂O fraction을 얻었으며 이를 농축하여 각각 3.602 g, 8.781 g, 1.240 g, 8.054 g 을 얻었다 (Scheme 1).



Scheme 1. Procedure of extraction and various fractions from *Sargassum thunbergii*.

(2) 지충이의 활성 성분 분리

지충이의 85% aq. MeOH fraction의 1/2 (4.32 g, w/w)을 덜어 RP flash column chromatography를 실행하여 각각 50% (rfc 1, 0.224 g), 60% (rfc 2, 0.063 g), 70% (rfc 3, 0.093 g), 80% (rfc 4, 0.195 g), 90% aq. MeOH (rfc 5, 0.634 g) 과 100% MeOH (rfc 6, 1.586 g) 그리고 100% EtOAc (rfc 7, 1.323 g) fraction을 얻었다.

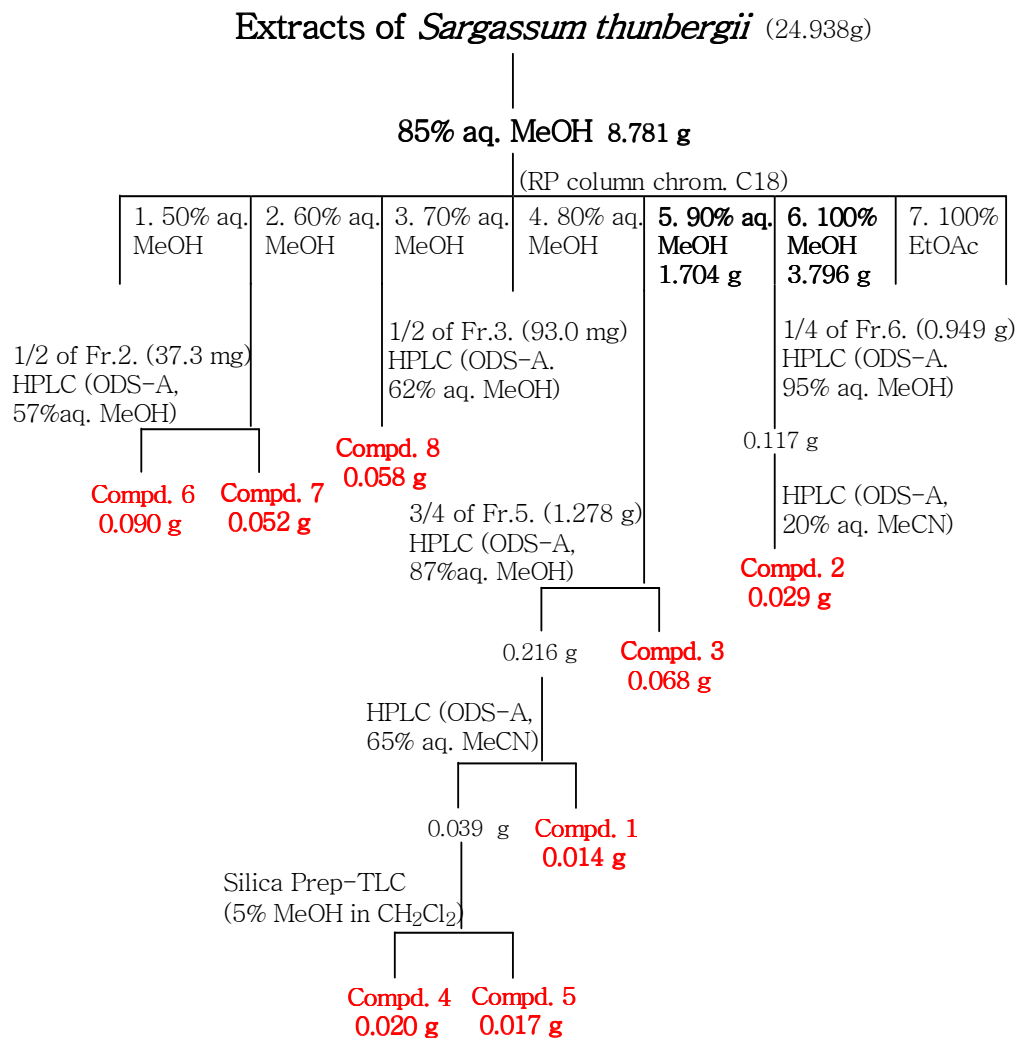
지충이의 85% aq. MeOH 층의 rfc 5 fraction 1/2 (0.337 g w/w) 덜어 87% aq. MeOH 용매로 역상 HPLC 하여 15개의 subfractions (rfc 5-1~15)을 얻었으며, 그 중 subfraction 14 (rfc 5-14, 0.068 g), compound **3**을 얻었고, 그 중 subfraction 10 (rfc 5-15, 0.216 g)을 다시 65% aq. MeCN 용매로 역상 HPLC 하여 21개의 subfractions (rp 10-1~21)을 얻었으며, 그 중 subfraction 16 (rp 10-16, 0.014 g), compound **1**을 얻었다. 그리고 다른 subfraction 13 (rp 10-13, 0.039 g)을 5% MeOH in CH₂Cl₂로 silica preparation TLC하여 subfractions (rp 13-1~2)을 얻었고, 그 중 subfraction 1 (rp 13-nt 1, 0.020 g)이 compound **4**이고 subfraction 2 (rp 13-nt 2, 0.017 g)가 compound **5**이다.

지충이의 85% aq. MeOH 층의 rfc 6을 1/2 (0.930 g w/w) 덜어 95% aq. MeOH 용매로 역상 HPLC 하여 17개의 subfractions (rfc 6-1~17)을 얻었고, 그 중 subfraction 11 (rfc 6-11, 0.147 g)을 다시 20% aq. MeCN 용매로 역상 HPLC 하여 20개의 subfractions (rp 11-1~20)을 얻었으며, 그 중 subfraction 19 (rp 11-19, 0.029 g), compound **2**를 얻었다.

지충이의 85% aq. MeOH 층의 rfc 2를 1/2 (0.037 g, w/w) 덜어 57% aq. MeOH 용매로 역상 HPLC하여 14개의 subfractions (rfc 2-1~14)를 얻었으며, 그 중 subfraction 4 (rfc 2-4, 0.009 g)와 subfraction 6 (rfc 2-6, 0.005 g), 각각 compound **6**과 **7**을 얻었다.

지충이의 85% aq. MeOH 층의 rfc 3을 1/2 (0.093 g, w/w)을 덜어 62% aq.

MeOH 용매로 HPLC하여 11개의 subfractions (rfc 3-1~11)을 얻었으며, 그 중 subfraction 8 (rfc 3-8, 0.006 g), compound 8을 얻었다 (Scheme 2).



Scheme 2. Isolation of the compounds 1-8 from *Sargassum thunbergii*.

Compound **1** : a colorless gum; FABMS m/z 449.2670 (M+ Na)⁺ (calcd for C₂₇H₃₈O₄Na, 449.2668); HMBC correlations H-1/C-2, C-3, C-1', C-2', C-3'; H-2/C-1, C-4, C-20, C-21; H-6/C-5, C-8, C-19; H-9/C-7, C-10, C-11; H-10/C-8, C-9, C-12, C-18; H-12/C-10, C-11, C-13, C-14, C-18; H-14/C-13, C-16, C-17; H-16/C-14, C-15, C-17; H-17/C-14, C-15, C-16; H-19/C-6, C-7, C-8; H-20/C-2, C-3, C-4; H-3'/C-1, C-1', C-4', C-5'; H-5'/C-1', C-3', C-4', Ar-CH₃; Ar-CH₃/C-1', C-5', C-6'; ¹H and ¹³C NMR spectral data (**Table 1**).

Compound **2** : a colorless gum; HRFABMS m/z 447.2510 (M+ Na)⁺ (calcd for C₂₇H₃₆O₄Na, 449.2512); HMBC correlations H-1/C-2, C-3, C-1', C-2', C-3'; H-2/C-1, C-4, C-20; H-6/C-4, C-5, C-8, C-19; H-9/C-7, C-8, C-10, C-11; H-10/C-8, C-12, C-18; H-12/C-10, C-11, C-13, C-14, C-18; H-14/ C-16, C-17; H-16/C-14, C-15, C-17; H-17/C-14, C-15, C-16; H-19/C-6, C-7, C-8; H-20/C-2, C-3, C-4; H-3'/C-1', C-5'; H-5'/C-1'; Ar-CH₃/C-1', C-5', C-6'; ¹H and ¹³C NMR spectral data (**Table 1**).

Compound **3** : a colorless gum; HRFABMS m/z 447.2514 (M+ Na)⁺ (calcd for C₂₇H₃₆O₄Na, 447.2512); HMBC correlations H-1/C-3, C-1', C-2', C-3'; H-2/C-3, C-4, C-20, C-2'; H-6/C-5, C-8, C-19; H-8/C-6, C-7, C-10; H-9/C-7, C-10, C-11; H-10/C-8, C-9, C-12, C-18; H-12/C-10, C-11, C-14, C-18; H-14/ C-13, C-15, C-16, C-17; H-16/C-14, C-15, C-17; H-17/C-14, C-15, C-16; H-19/C-6, C-7; H-20/C-2, C-3, C-4; H-3'/C-1' C-5' H-5'/C-1', C-3', Ar-CH₃; Ar-CH₃/C-1', C-5', C-6'; ¹H and ¹³C NMR spectral data (**Table 1**).

Compound **4**: a colorless gum; $[\alpha]_D^{25}$: -20.5 (0.1, MeOH); UV (MeOH): $\lambda_{\max}(\log \epsilon) = 300$ (3.31) nm; IR (KBr): $\nu_{\max}=3510$, cm^{-1} ; HRFABMS m/z 465.2619 (M+Na)⁺ (calcd for C₂₇H₃₈O₅Na, 465.2617); HMBC correlations: H-1/C-2, C-3, C-1', C-2'; H-2/C-20, C-1', C-2'; H-4/C-5; H-5/C-3, C-7; H-6/C-5, C-8, C-19; H-8/C-6, C-7, C-19; H-9/C-7, C-8, C-10, C-11; H-10/C-8, C-9, C-12, C-18; H-12/C-10, C-11, C-13, C-14, C-18; H-13/C-12, C-15; H-14/C-16; H-16/C-14, C-15, C-17; H-17/C-14, C-15, C-16; H-15/C-6, C-7, C-8; H-20/C-2, C-3, C-4; H-3'/C-1', C-4', C-5'; H-5'/C-1', C-3'; Ar-Me/C-1'. C-5', C-6'; ¹H and ¹³C NMR spectral data (**Table 1, 2**).

Compound **5**: a colorless gum; $[\alpha]_D^{25}$: -30.8 (0.1, MeOH); UV (MeOH): $\lambda_{\max}(\log \epsilon) = 297$ (3.28) nm; IR (KBr): $\nu_{\max}=3510$, cm^{-1} ; HRFABMS m/z 449.2620 (M+Na)⁺ (calcd for C₂₇H₃₈O₄Na, 449.2617); HMBC correlations: H-1/C-2, C-3, C-1', C-2', C-3'; H-2/ C-20, C-2'; H-4/C-5; H-5/C-3, C-7; H-6/C-5, C-8, C-19; H-8/C-6, C-7, C-19; H-9/C-7, C-8, C-10, C-11; H-10/C-8, C-9, C-12, C-18; H-12/C-10, C-11, C-13, C-14, C-18; H-13/C-12, C-15, ; H-14/ C-16; H-16/ C-14, C-15, C-17; H-17/C-14, C-15, C-16; H-19/C-6, C-7, C-8; H-20/C-2, C-3, C-4; H-3'/C-1', C-4', C-5'; H-5'/C-1', C-3'; Ar-Me/C-1'. ¹H and ¹³C NMR spectral data (**Table 1, 2**).

Compound **6**: a colorless gum; $[\alpha]_D^{22}$: +82.5 (0.01, CHCl₃); LRFABMS m/z (C₁₁H₁₆O₃ + H)⁺ 197; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 1.26 (3H, s, H-10), 1.31 (3H, s, H-9), 1.33 (1H, t, J = 12.1 Hz, H-5), 1.51 (1H, t, J = 11.8 Hz, H-7), 1.58 (3H, s, H-8), 1.583 (s, OH), 2.00 (1H, ddd, J = 2.2, 4.2 and 11.7 Hz, H-5), 2.53 (1H, ddd, J = 2.2, 4.2 and 11.2 Hz, H-7), 4.12 (1H, tt, J = 4.1 and 12.3 Hz, H-6), 5.70 (1H, s, H-3); ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 1.28 (3H, s, axial, H-10), 1.28 (1H, dd, J = 9.8 and 9.8 Hz, H-5), 1.31 (3H, s, H-9), 1.42 (1H, dd, J = 11.7 and 11.7 Hz, H-7), 1.59 (3H, s, axial, H-8), 2.00 (1H, ddd, J = 2.2, 4.3 and 13.0 Hz, H-5), 2.46 (ddd, J = 2.2, 3.9 and 11.7 Hz, H-7), 4.09 (1H, m, H-6), 5.77 (1H, s, H-3); ¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ : 25.34 (C-10), 25.82 (C-9), 30.33 (C-8), 36.18 (C-4), 49.81 (C-7), 50.69 (C-5), 65.21 (C-6), 88.49 (C-7a), 113.59 (C-3), 173.77 (C-2), 183.67 (C-3a). ¹H and ¹³C NMR spectral data.

Compound **7**: a colorless gum; $[\alpha]_D^{22}$: -100.5 (0.01, CHCl₃); LRFABMS m/z (C₁₁H₁₆O₃ + H)⁺ 197; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 1.27 (3H, s, H-9), 1.47 (3H, s, H-8), 1.52 (dd, J = 13.7 and 3.9 Hz, H-7), 1.76 (dd, J = 13.7 and 4.1 Hz, H-5), 1.78 (3H, s, H-10), 1.98 (dt, J = 2.4 and 14.0 Hz, H-7), 2.54 (dt, J = 2.8 and 14.0 Hz, H-5), 4.30 (m, H-6), 5.69 (s, H-3); ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 1.26 (3H, s, H-9), 1.47 (3H, s, axial, H-8), 1.50 (1H, dd, J = 14.3 Journal of the Korean Chemical Society and 3.6 Hz, H-7), 1.75 (1H, dd, J = 13.8 and 3.9 Hz, H-5), 1.78 (3H, s, equatorial, H-10), 2.01 (dt, J = 14.3 and 2.6 Hz, axial, H-7), 2.48 (1H, dt, J = 13.8 and 2.6 Hz, axial, H-5), 4.30 (1H, brq, J = 3.4 Hz, H-6), 5.67 (1H, s, H-3); ¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ : 26.86 (C-10), 26.36 (C-9), 30.57 (C-8), 36.00 (C-4), 45.42 (C-7), 47.03 (C-5), 66.28 (C-6), 87.13 (C-7a), 112.36 (C-3), 172.15 (C-2), 183.00 (C-3a). ¹H and ¹³C NMR spectral data.

Compound **8** : a colorless gum; negative FABMS m/z ($C_{15}H_{22}O_4-H$). 265; 1H -NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 1.16 (3H, s, H-12), 1.43 (6H, s, H-11 and 13), 1.44 (1H, m, H-2a), 1.52 (dd, $J = 12.9$ and 11.3 Hz, H-4b), 2.03 (1H, m, H-2b), 2.04 (3H, s, H-15), 2.18 (3H, s, H-10), 2.33 (ddd, $J = 2.2, 4.4$ and 13.1 Hz, H-4a), 5.37 (1H, tt, $J = 11.4$ and 4.3 Hz, H-3), 5.86 (1H, s, H-8); ^{13}C -NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ : 21.42 (C-15), 26.49 (C-10), 28.99 (C-11), 30.87 (C-13), 31.68 (C-12), 36.08 (C-1), 45.02 (C-2), 45.07 (C-4), 67.44 (C-3), 72.02 (C-5), 100.83 (C-8), 118.33 (C-6), 170.25 (C-14), 197.87 (C-9), 209.27 (C-7). 1H and ^{13}C NMR spectral data.

Table 1. NMR spectral Assignments for Compounds 4 and 5^a

no	4		5	
	H	C	H	C
1	3.1 (1H, dd, 16.0, 8.8) 3.0 (1H, dd, 16.0, 9.3)	31.0 t	2.9 (1H, dd, 16.8, 4.8) 2.6 (1H, dd, 16.8, 4.8)	31.5 t
2	3.0 (1H, t, 9.1)	88.3 d	3.7 (1H, t, 4.8)	68.7 d
3		73.7 s		78.0 s
4	1.4 (2H, t, 6.6)	36.9 t	1.5 (2H, m)	36.8 t
5	2.0 (2H, m)	22.0 t	2.0 (2H, m)	21.7 t
6	5.1 (1H, 6.6)	124.7 d	5.0 (1H, t, 7.4)	124.5 d
7		134.6 s		134.6 s
8	2.0 (2H, t, 7.4)	39.1 t	2.0 (2H, t, 7.4)	39.1 t
9	2.5 (2H, t, 7.4)	28.3 t	2.5 (2H, q, 7.3)	28.2 t
10	5.9 (1H, t, 7.2)	145.2 d	5.9 (1H, t, 7.2)	145.0 d
11		130.5 s		130.5 s
12	2.2 (2H, q, 8.0)	34.6 t	2.2 (2H, t, 7.0)	34.6 t
13	2.1 (2H, m)	27.9 t	2.0 (2H, m)	27.9 t
14	5.0 (1H, t, 9.9)	123.3 d	5.0 (1H, m)	123.3 d
15		132.2 s		132.2 s
16	1.6 (3H, s)	25.8 q	1.6 (3H, s)	25.7 q
17	1.5 (3H, s)	17.8 q	1.5 (3H, s)	17.8 q
18		172.3 s		172.1 s
19	1.5 (3H, s)	16.0 q	1.5 (3H, s)	15.9 q
20	1.2 (3H, s)	23.1 q	1.2 (3H, s)	19.2 q
1'		151.8 s		144.4 s
2'		127.2 s		119.1 s
3'	6.3 (1H, d, 2.1)	109.3 d	6.3 (1H, d, 2.2)	113.1 d
4'		149.4 s		148.5 s
5'	6.4 (1H, d, 2.1)	115.5 d	6.4 (1H, d, 2.2)	116.1 d
6'		119.6 s		127.4 s
Ar-Me	2.1 (3H, s)	15.4 q	2.1 (3H, s)	16.2 q

^a ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were based upon ¹H COSY, TOCSY, HSQC, and HMBC experiments.

Table 2. ^{13}C NMR spectral Assignments for Compounds 1–5^a

no	1	2	3	4	5
1	30.0 t	27.6 t	122.8 d	31.0 t	31.5 t
2	121.7 d	117.9 d	130.5 d	88.3 d	68.7 d
3	138.0 s	139.7 s	77.7 s	73.7 s	78.0 s
4	39.5 t	39.6 t	40.8 t	36.9 t	36.8 t
5	26.1 t	26.4 t	22.7 t	22.0 t	21.7 t
6	124.2 d	124.4 d	124.8 d	124.7 d	124.5 d
7	134.6 s	134.5 s	134.2 s	134.6 s	134.6 s
8	39.1 t	39.1 t	39.1 t	39.1 t	39.1 t
9	28.4 t	28.3 t	28.2 t	28.3 t	28.2 t
10	145.3 d	145.3 d	145.4 d	145.2 d	145.0 d
11	130.5 s	130.5 s	130.4 s	130.5 s	130.5 s
12	34.6 t	34.6 t	34.6 t	34.6 t	34.6 t
13	27.9 t	27.9 t	27.9 t	27.9 t	27.9 t
14	123.4 d	123.4 d	123.3 d	123.3 d	123.3 d
15	132.1 s	132.1 s	132.1 s	132.2 s	132.2 s
16	25.7 q	25.7 q	25.7 q	25.8q	25.7 q
17	17.8 q	17.8 q	17.8 q	17.8 q	17.8 q
18	172.5 s	172.7 s	172.9 s	172.3s	172.1 s
19	16.1 q	16.1 q	15.6 q	16.0 q	15.9 q
20	16.2 q	16.2 q	26.0 q	23.1 q	19.2 q
1'	146.2 s	187.9 s	144.6 s	151.8 s	144.4 s
2'	127.5 s	148.4 s	121.2 s	127.2 s	119.1 s
3'	113.9 d	132.1 d	110.3 d	109.3 d	113.1 d
4'	148.6 s	187.8 s	148.5 s	149.4 s	148.5 s
5'	115.4 d	133.0 d	117.0 d	115.5 d	116.1 d
6'	125.4 s	145.8 s	126.2 s	119.6 s	127.4 s
Ar-Me	16.2 q	16.0 q	15.8 q	15.4 q	16.2 q

^a ^{13}C NMR spectra were recorded in CDCl_3 solution at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were based upon ^1H COSY, TOCSY, HSQC, and HMBC experiments.

2-5. 항산화 활성 실험

(1) DPPH radical 소거 활성

1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) 소거작용은 광범위하게 쓰이는 간단한 항산화 검색법으로 특히 phenol과 aromatic amines의 항산화 활성의 측정에 많이 사용하는 방법이다 (Blois, 1958). 일종의 염료인 diphenylpicrylhydrazine은 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 518 nm에서 강한 흡수 띠를 보인다. 그러나 phenol과 같이 수소나 전자를 제공해주는 전자공여체와 반응을 하게 되면 공여체로부터 전자나 hydrogen radical을 생성하게 된다. 이때 흡수 띠도 사라지고 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며, 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH의 색깔은 점점 없어지게 되고, 흡광도도 감소하게 되므로 반응액의 색이 노란색으로 변하는 것을 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거활성을 알 수 있다 (Fig. 2).

구체적인 실험 방법은 다음과 같다.

먼저 각 농도별 시료 (10~200 $\mu\text{g/ml}$)를 MeOH에 녹여 준비한다. DPPH 시약 2 mg을 정확히 칭량하여 EtOH 15 ml에 녹인다. 앞에서 만든 원액 1200 μl 에 DMSO 500 μl 와 EtOH를 3000 μl 를 섞어 DPPH 희석액을 만든다. DPPH 희석액 900 μl 를 cuvette안에 넣고 흡광도를 측정하여 흡광도가 0.94~0.97이 되도록 맞춘다. 이때 0.97이상이면 EtOH를 더 넣어 희석하여 측정하고, 너무 낮으면 DPPH 원액을 넣는다. 흡광도가 맞으면 먼저 준비한 시료를 100 μl 와 섞은 후 10분후에 UV값을 518 nm에서 측정한다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 free radical 소거활성을 백분율로 나타내고, 50% 저해농도 (IC_{50})를 계산하였다. 측정치는 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다 (Scheme 3).

$$\text{EDA (electron donating ability)}(\%) = \frac{\text{대조군 흡광도} - \text{실험군 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

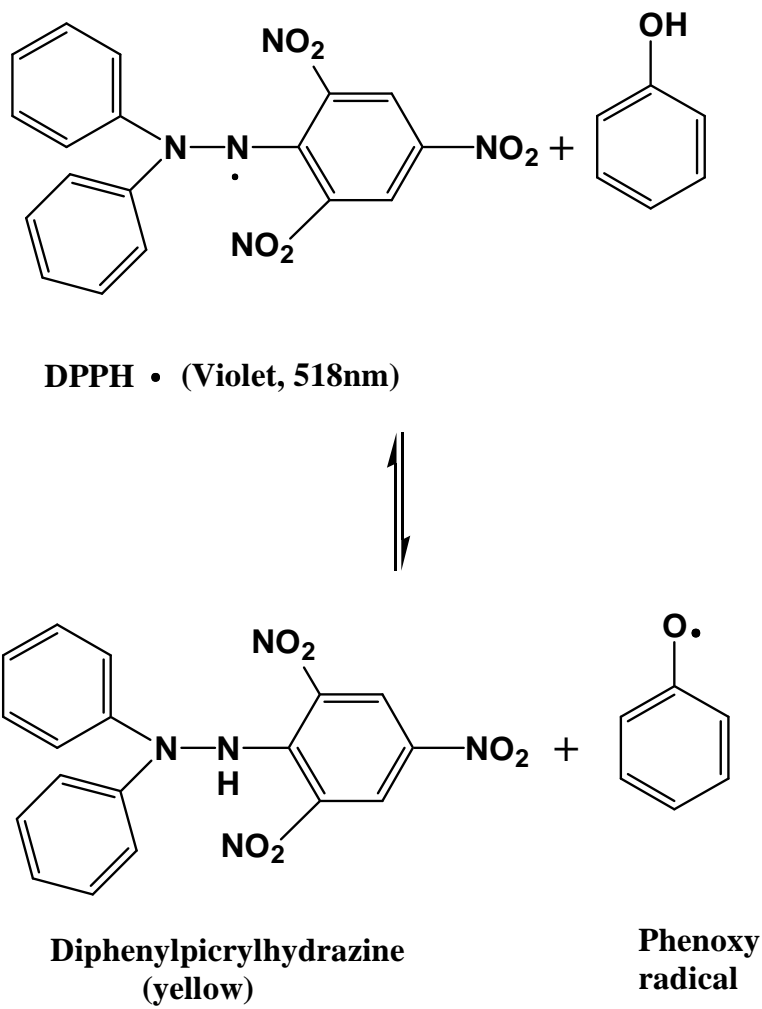
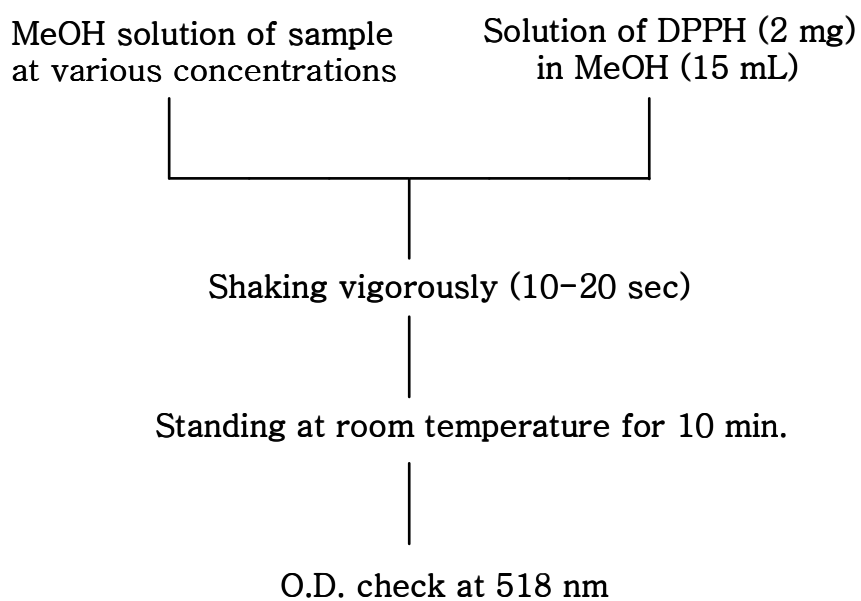


Fig. 2. Scavenging of the DPPH radical by phenol (Blois, 1958).



Scheme 3. Measurement of DPPH radical scavenging effect.

(2) peroxynitrite 소거 활성

ONOO⁻ 소거 활성은 dihydrorhodamine 123 (DHR 123)의 산화되는 정도를 측정함으로써 검색하였다 (**Fig. 3**). DHR 123 (5 mM)을 dimethylformamide로 녹여서 stock 용액은 질소로 purge하여 -80 °C에 보관하고, DHR123 (f.c. 5 μM) 용액의 희석은 암실의 얼음 위에서, 사용하기 전에 조제하였다. Buffer는 90 mM sodium chloride, 50 mM sodium phosphate (pH 7.4)와 5 mM potassium chloride, DTPA (diethylenetriaminepenta acetic acid) 100 μM (f.c.)을 혼합하여 조제하며 사용하기 전에 냉장 보관하였다. 이 buffer용액에 DHR 123 용액을 혼합한 뒤 시료와 peroxynitrite를 첨가하고 실온에서 5분간 방치하였다. 그리고는 multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer Synergy HT (Bio-Tek instruments, USA)로 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가하는 경우는 실온에서 1시간 동안 방치한 후 측정하였다. SIN-1에 의한 DHR 123의 산화는 점진적으로 일어나는 반면에 authentic peroxynitrite는 아주 급속히 산화를 시키기 때문이다. Excitation 파장은 485 nm, emission 파장은 530 nm로 하였으며 실온에서 측정하였다. 그리고 ONOO⁻ (f.c. 10 μM)의 바탕용액은 0.3N NaOH를 사용하였고, 실험은 triplicate로 행하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율로 계산하였다 (Kooy *et al.* 1994) (**Scheme 4**).

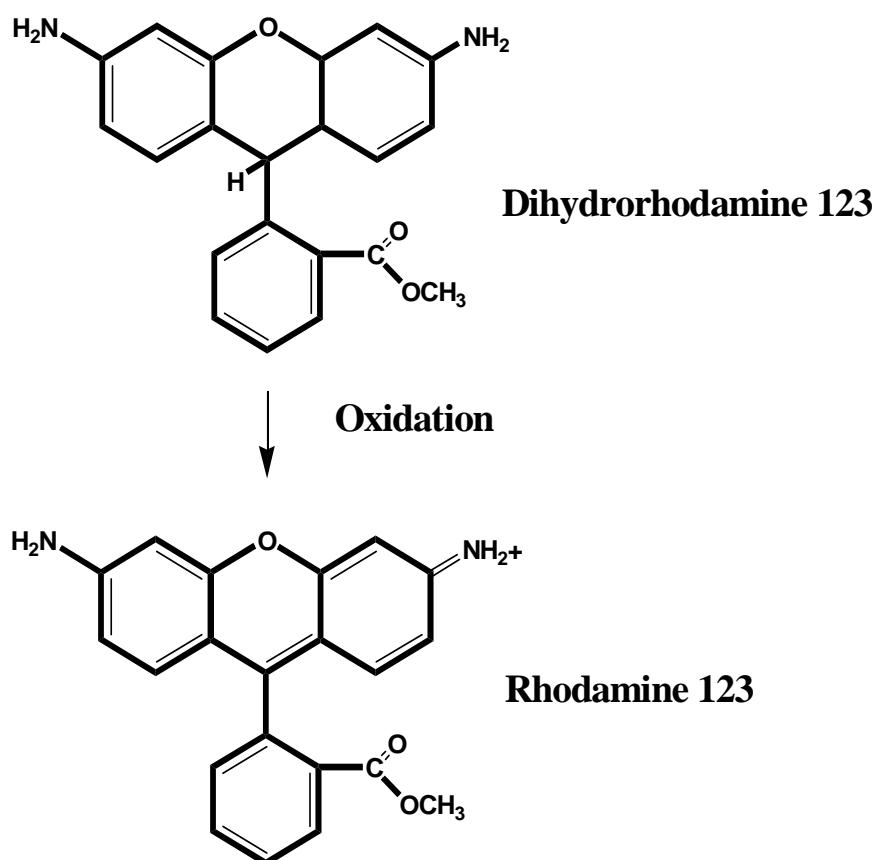


Fig. 3. Peroxynitrite (ONOO^-) mediated oxidation of DHR123.

Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 100 μ M



Dihydrorhodamine 123 5 μ M



Incubation at 37 °C for 1 min



Sample



SIN-1 200 μ M or peroxynitrite 5 μ M



Measurement of fluorescence intensity

Excitation wavelength at 480 nm

Emission wavelength at 525 nm

Scheme 4. Measurement of the ONOO^- scavenging activity.

3. 결과 및 고찰

3-1. 지층이에서 분리된 화합물들의 구조결정

Compound 1은 무색의 gum으로 분리되었으며, FRFABMS와 ^{13}C NMR spectrum에 의해 분자식이 $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_4$ 였다. 또한 ^{13}C NMR spectrum에서 δ 150-110 영역의 carbon signal과 ^1H NMR spectrum에서 δ 6.47 (1H, br s)과 6.65 (1H br s)의 signal에 의해 aromatic ring이 있음을 알 수 있었다. 그리고 ^{13}C NMR spectrum에서 δ 172.5의 signal과 IR spectrum에서 V_{\max} 1680cm^{-1} 의 강한 흡수 band와 $3400\text{-}2500\text{cm}^{-1}$ 의 broad한 band로써 carboxylic acid의 작용기의 존재를 추정할 수 있었다.

이 화합물의 전체적인 구조는 ^1H COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC와 같은 2D NMR 실험을 하여 구조를 결정하였다. 적어도 1개의 methyl기를 비롯한 4개의 3치환된 이중결합의 존재는 ^1H COSY spectrum에서 vinyl methyl proton signal들과 olefinic proton signal의 long-ranged coupling을 확인함으로써 알 수 있었다. 그리고 olefinic과 고자장 proton signal들 사이의 proton-proton coupling과 vinyl methyl 1-3 protons과 이웃한 carbon의 HMBC correlation은 C-11'이 carboxylic acid를 가지고 있는 geranyl geranyl 사슬임을 의미하였다. 게다가 ^1H 와 ^{13}C NMR spectrum에서 저자장 영역의 signal과 2D NMR을 분석한 결과 aromatic ring이 1,4-dihydroquinone임을 알 수 있었으며 δ 6.47과 δ 6.45에 나타난 aromatic proton 신호들 사이의 작은 coupling constant (2 Hz)는 meta 치환된 형태임을 알 수 있었다. δ 2.17 (3H, br s)에 나타난 methyl proton signal과 δ 6.47과 δ 6.45의 long-range coupling에 의해 C-6'에 benzylic methyl기가 존재함이 확인되었다. 따라서 aromatic 부분의 구조는 2-alkyl-6-methyl-1,4-hydroquinone으로 결정되었다. 이 화합물에 문헌조사 결과 이미 *Sagassum sagamianum* var. *yezoense*에서 보고된 sargahydroquinoic acid임이 확인되었으며 NMR 스펙트럼 데이터를 비교한 결과 문헌치와 잘 일치하였다 (Seagawa and Shirahama, 1987)(Fig. 4-10).

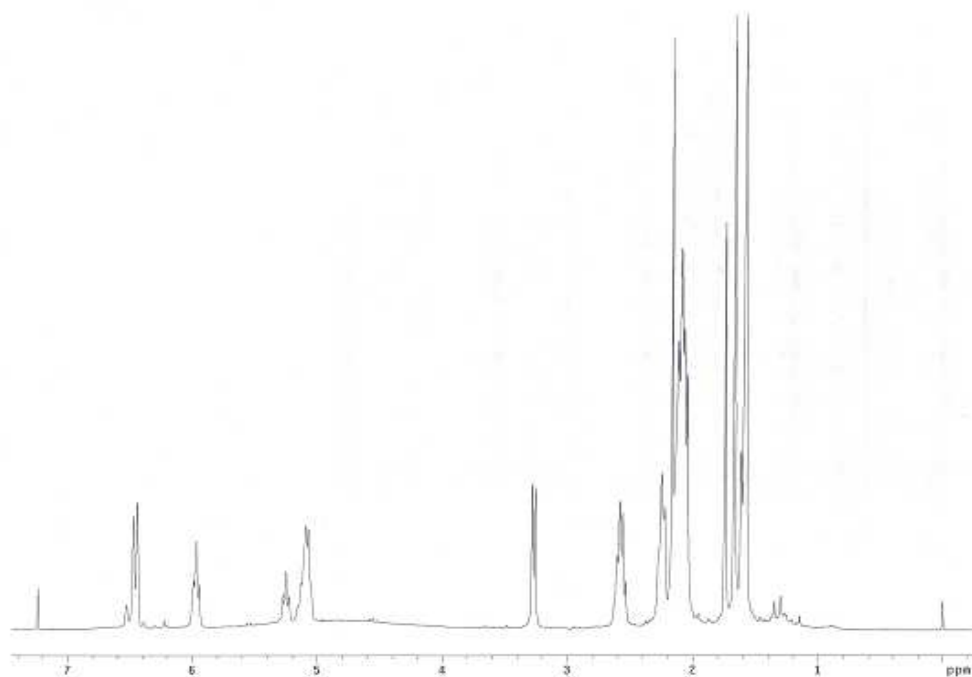


Fig. 4. ^1H NMR spectrum of compound 1 in CDCl_3 .

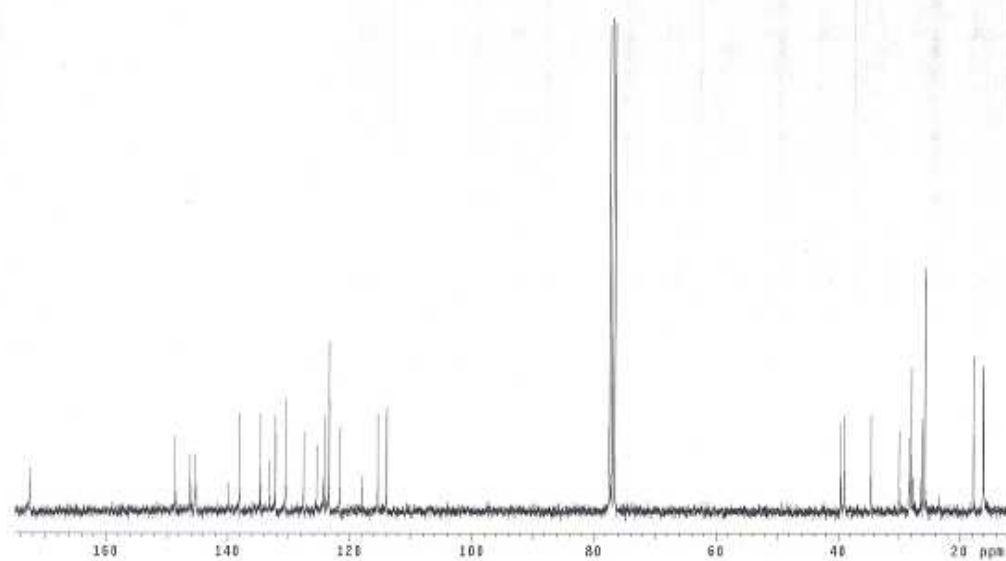


Fig. 5. ^{13}C NMR spectrum of compound 1 in CDCl_3 .

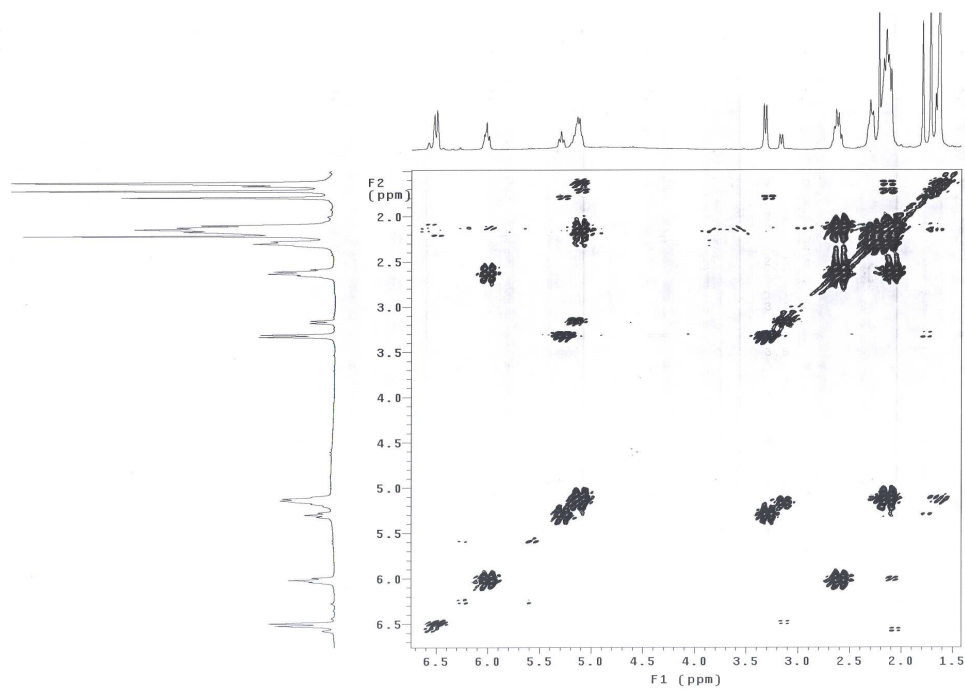


Fig. 6. gDQCOSY spectrum of compound 1 in CDCl_3 .

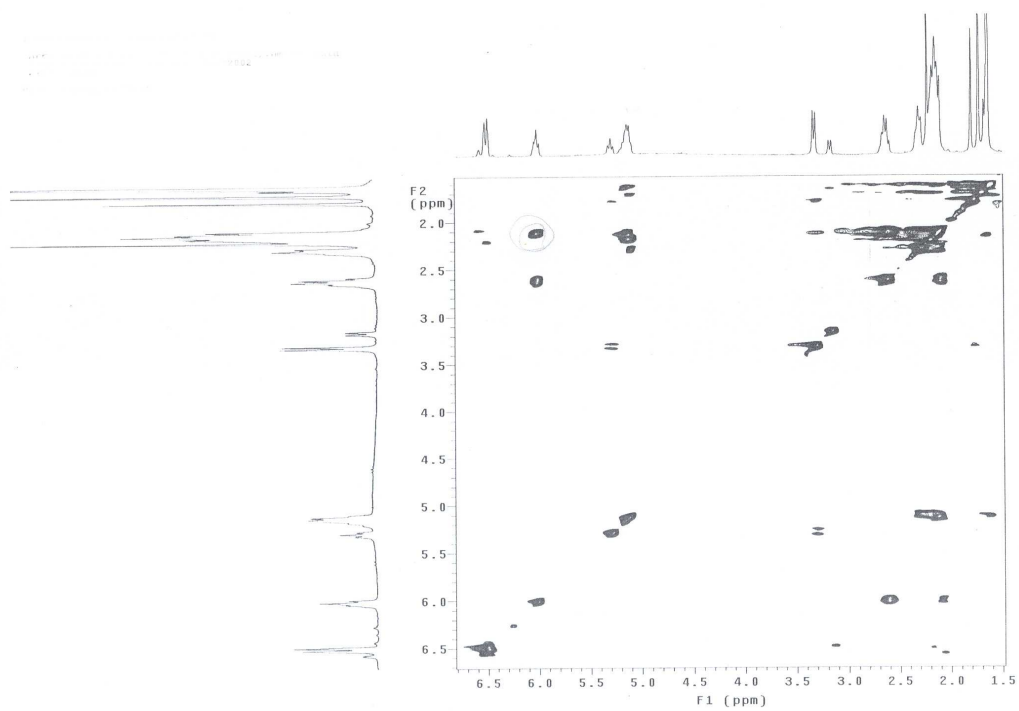


Fig. 7. TOCSY spectrum of compound 1 in CDCl_3 .

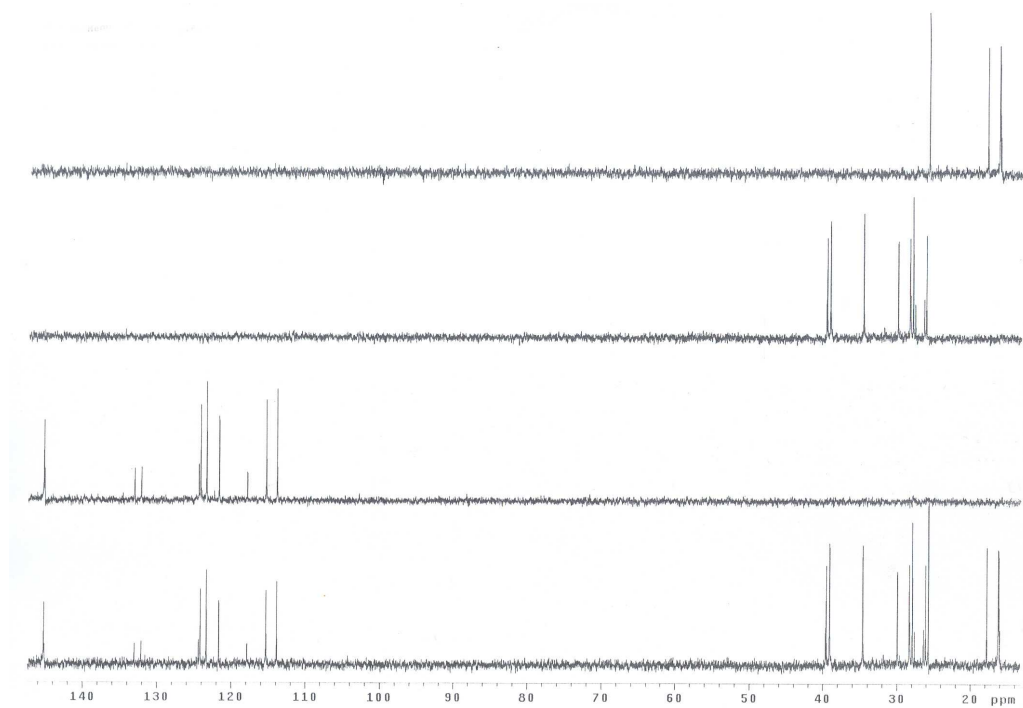


Fig. 8. DEPT spectrum of compound 1 in CDCl_3 .

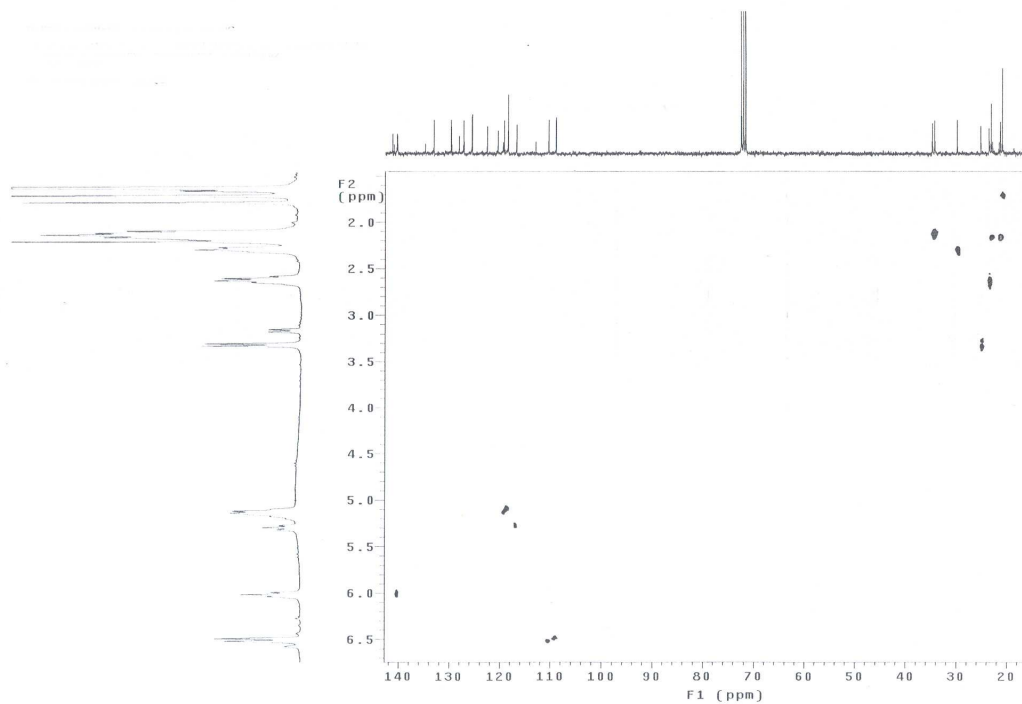


Fig. 9. HSQC spectrum of compound 1 in CDCl_3 .

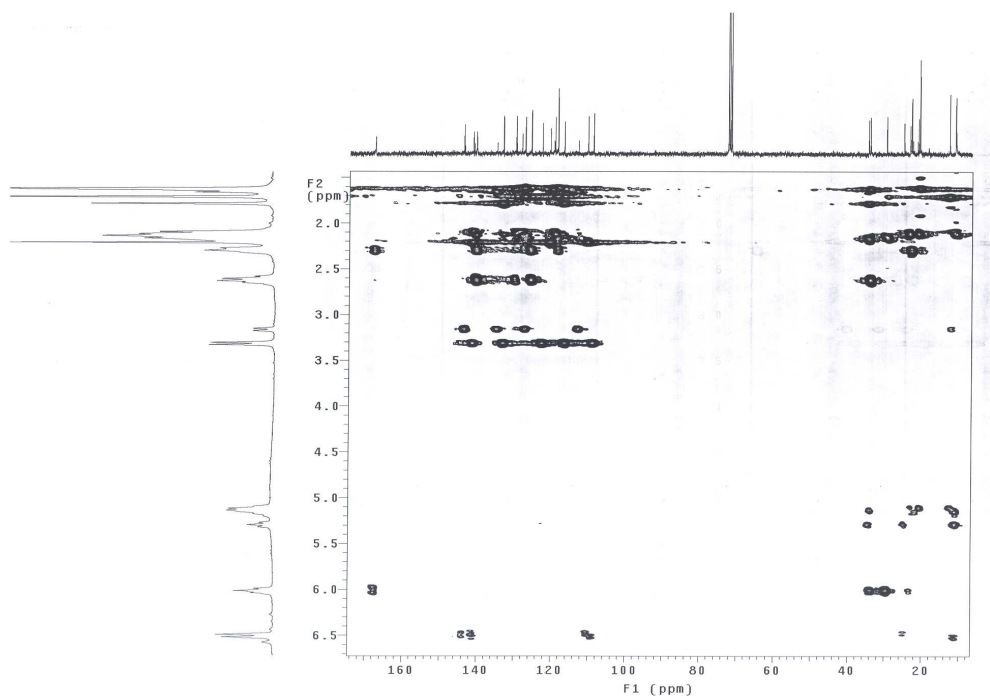


Fig. 10. gHMBC spectrum of compound 1 in CDCl_3 .

Compound 2도 또한 무색의 gum이었으며 HRFABMS와 ^{13}C NMR spectrum로 분석한 결과 compound 1과 매우 유사한 유도체임을 알 수 있었다. ^{13}C NMR spectrum에서 나타난 가장 두드러진 차이점은 δ 148.6, 146.2 에서의 4급 탄소 signal이 δ 187.7, 187.9로 저자장 쪽으로 이동되었으며, 이 signal들은 compound 1의 hydroquinone ring이 산화되어 형성된 quinone ring에 존재하는 2개의 ketone 탄소인 C-1와 C-4로 확인되었다. 따라서 compound 2의 구조는 5-methyl-2-[(2E,6E,10Z)-11-carboxyl-3,7,15-trimethyl-2,6,10,14-hexadeca-tetraenyl]-2,5-cyclohexadien-1,4-dione로 결정되었으며, 문헌조사결과 이전에 분리되었던 sargaquinoic acid임이 확인되었다 (Kusumi *et al.*, 1979; Silva *et al.*, 2001)(Fig. 11-17).

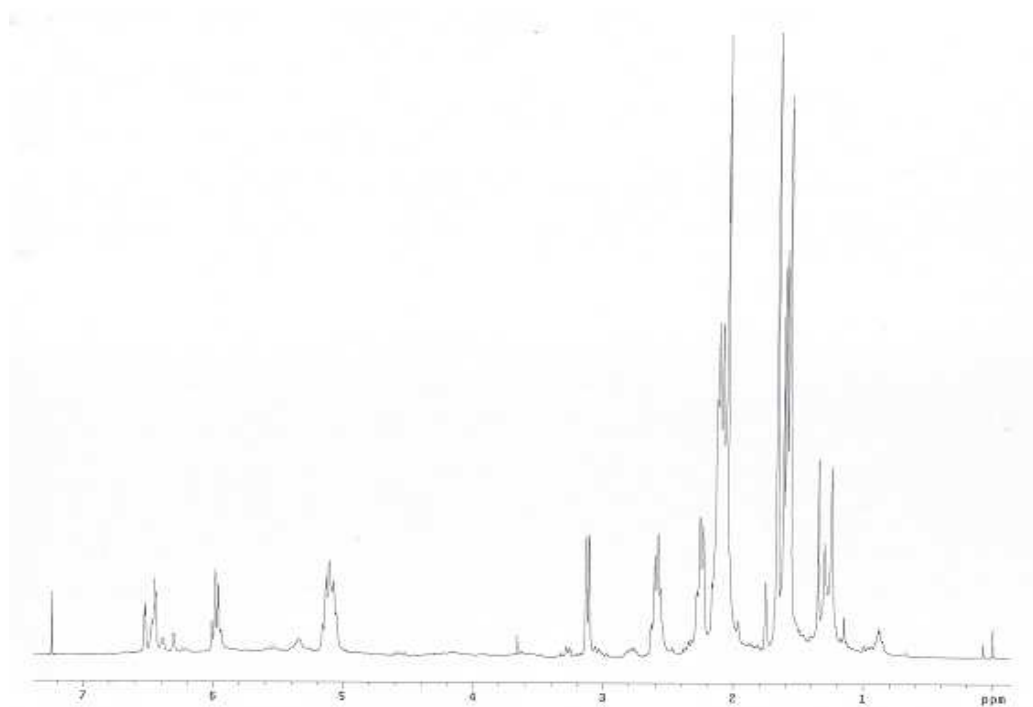


Fig. 11. ^1H NMR spectrum of compound 2 in CDCl_3 .

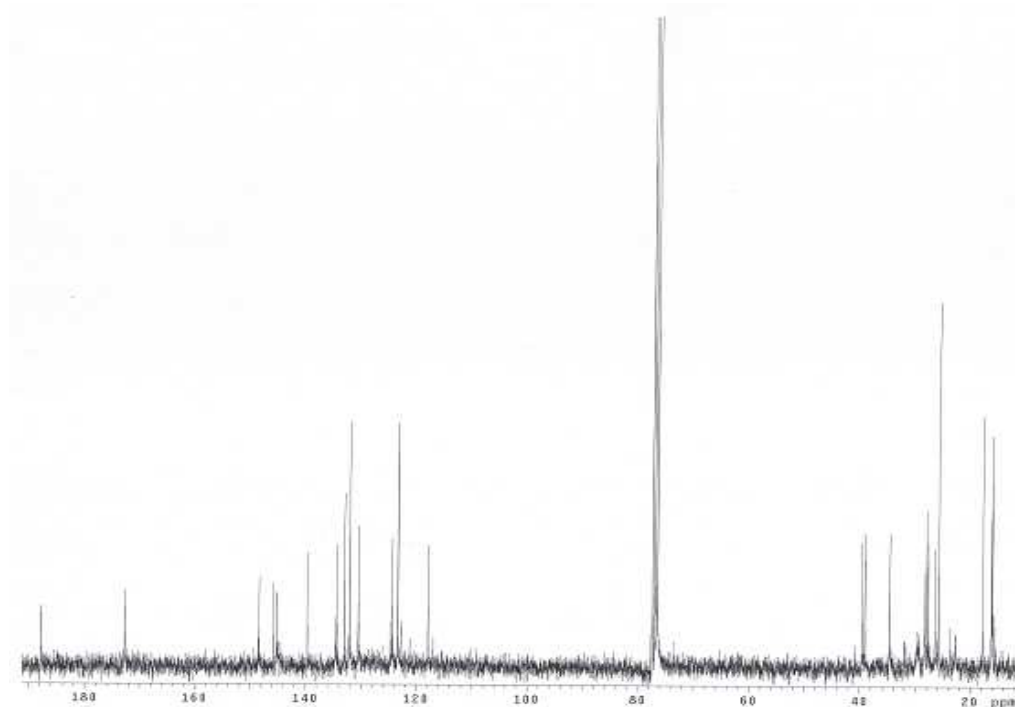


Fig. 12. ^{13}C NMR spectrum of compound 2 in CDCl_3 .

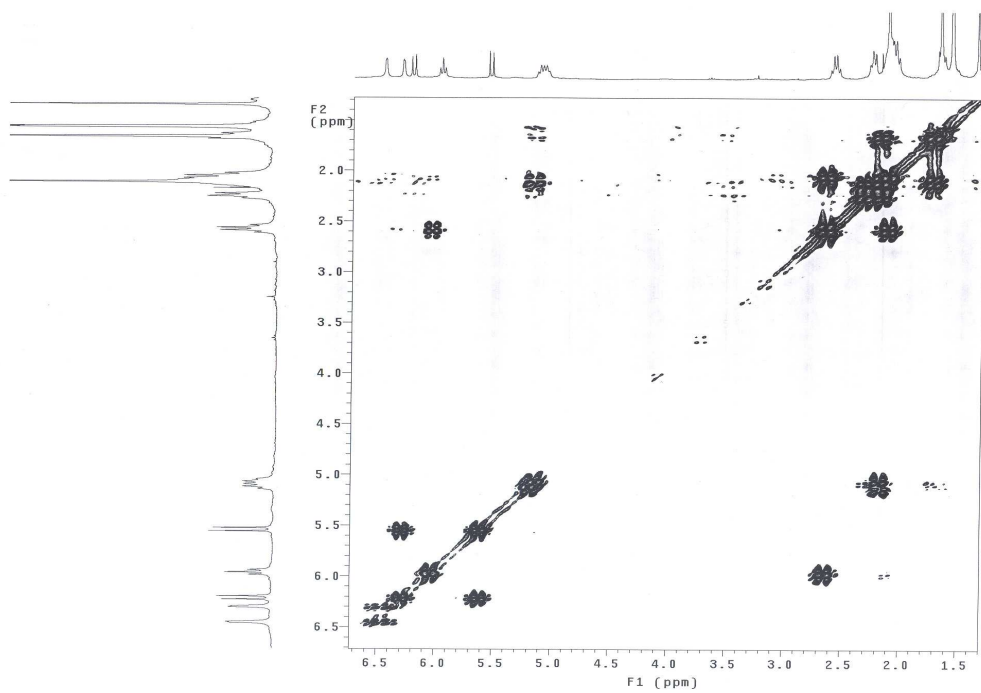


Fig. 13. gDQCOSY spectrum of compound 2 in CDCl₃.

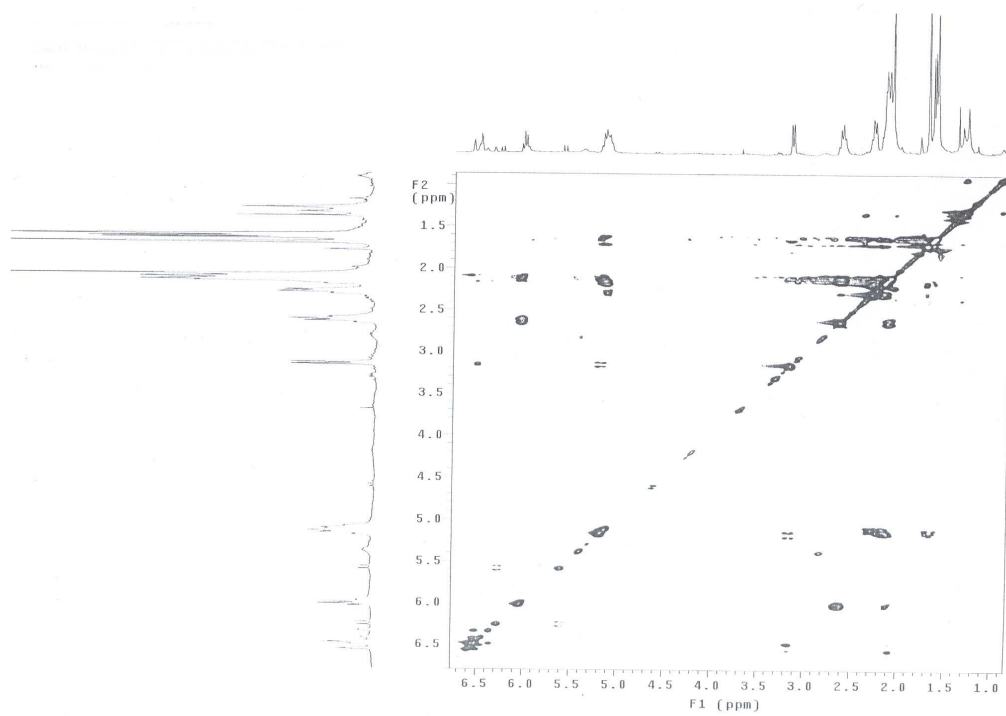


Fig. 14. TOCSY spectrum of compound 2 in CDCl₃.

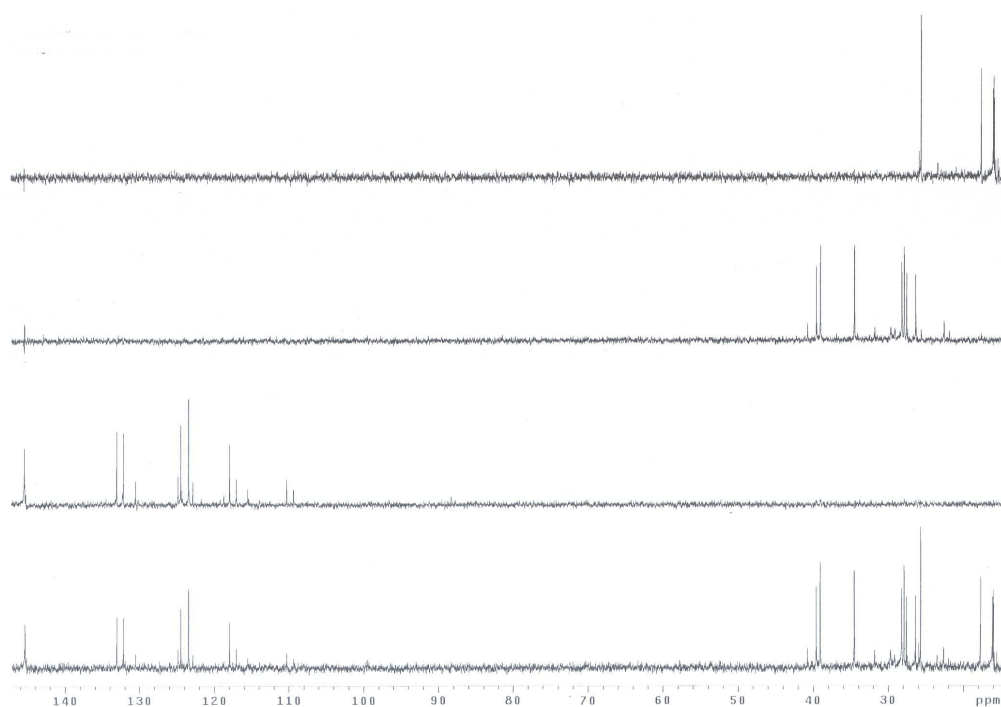


Fig. 15. DEPT spectrum of compound 2 in CDCl_3 .

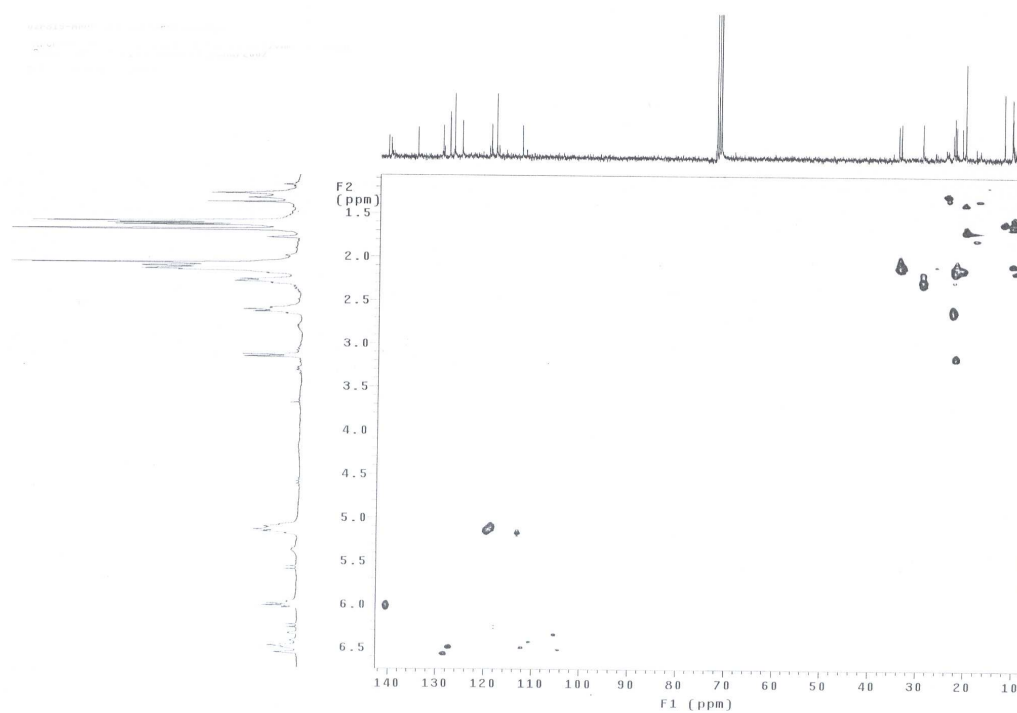


Fig. 16. HMQC spectrum of compound 2 in CDCl_3 .

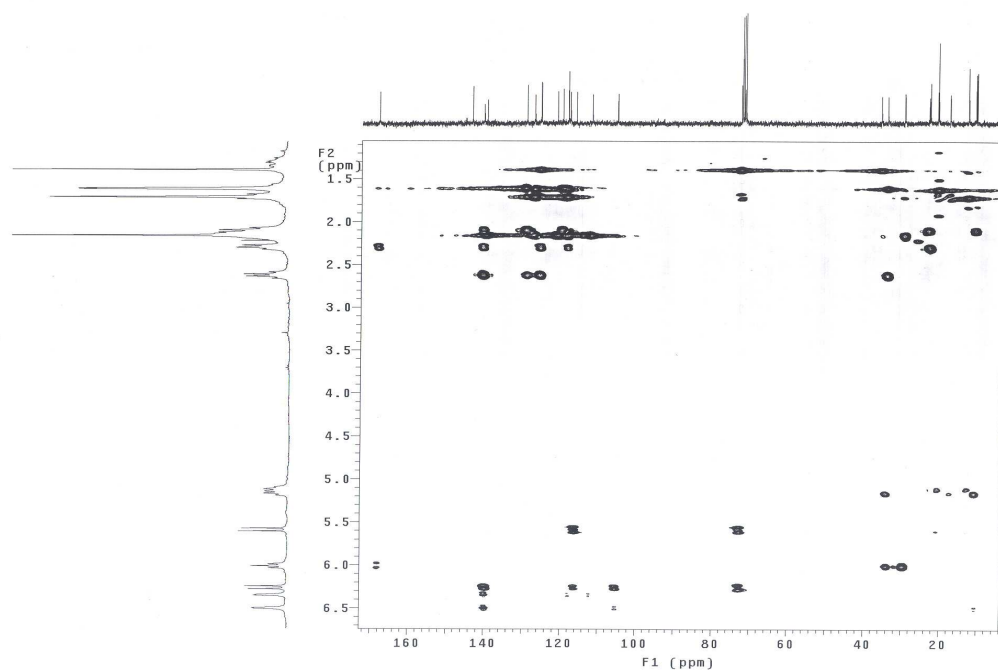


Fig. 17. gHMBC spectrum of compound 2 in CDCl_3 .

Compound **3**은 무색의 gum으로 분리되었으며, 분자식은 HRFABMS와 ^{13}C NMR spectrum에 의해 $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_4$ 로 확인되었다. 이 화합물의 spectral data는 compound **1**과 비교하였을 때 나타난 가장 큰 특징은 ^{13}C NMR spectrum에서 새로운 oxygenated tertiary carbon (δ 77.7) signal과 함께 ^1H NMR spectrum에서 새로운 olefinic proton들에 기인된 AB system (δ 6.21, 5.54, $J=9.6\text{Hz}$)의 signal들이 나타났다. 이러한 변화는 compound **1**에 존재하는 C-1의 benzyl methylene protons과 인접한 vinyl proton 사이에 이중결합의 재배치가 일어나고 1'-OH 와 C-3사이에 새로운 cyclic ether 결합이 도입되어 chromene ring이 형성됨으로써 설명될 수 있었다. 이 사실은 HMBC 실험에서 olefinic proton H-1과 C-3, C-1', C-2' 및 C-3' 사이의 correlations 그리고 H-20 methyl protons과 C-2사이의 correlation에 의해서도 증명되었다. 따라서 compound **3**의 구조는 2-[(3E,7Z)-(8-carboxyl-4,12-dimethyltrideca-3,7,11-trienyl)]-2,8-dimethyl-2H-chromen-6-ol로 결정되었으며, 이전에 문헌에서 보고된 sargachromenol의 NMR 데이터와 잘 일치하였다 (Kusumi *et al.*, 1979; Silva *et al.*, 2001).

이 화합물들 (**1-3**)이 갈조류에서 이미 보고되었다 하더라도 수소와 탄소에 대한 완전한 assignment는 보고되지 않았다 (Amico *et al.*, 1987; rivera *et al.*, 1990, Numata *et al.*, 1991; 1992; davyt *et al.*, 1997). 본 연구에서 ^1H COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC와 같은 2D NMR을 이용하여 plastoquinone 구조들의 완전한 assignment를 하였다 (Fig. 18-24).

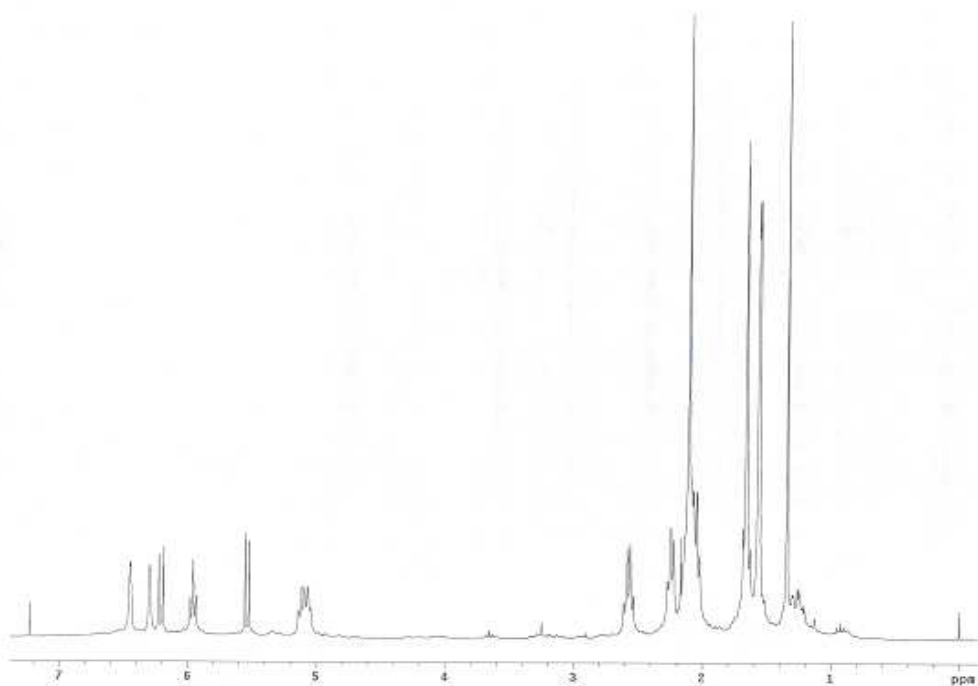


Fig. 18. ^1H NMR spectrum of compound 3 in CDCl_3 .

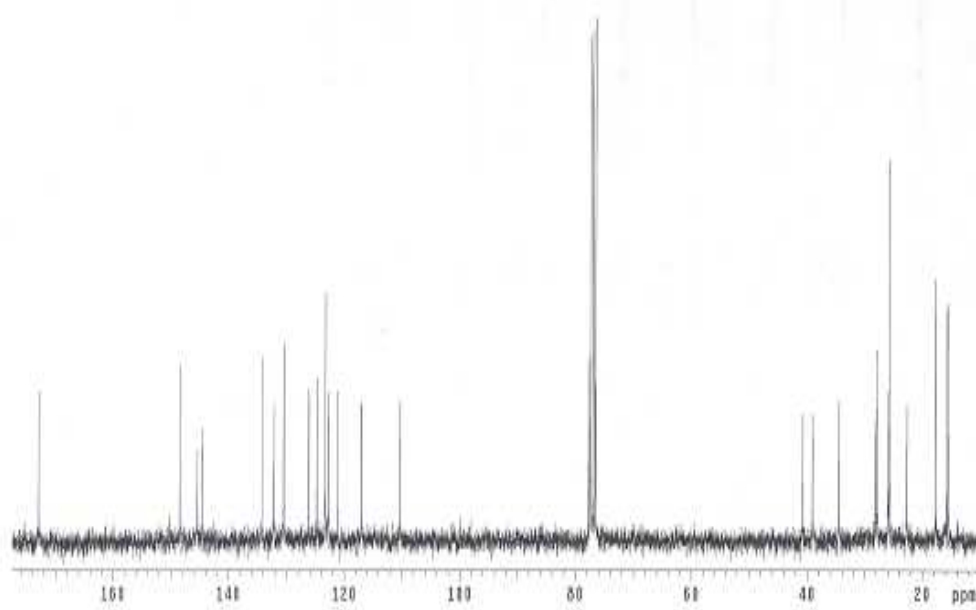


Fig. 19. ^{13}C NMR spectrum of compound 3 in CDCl_3 .

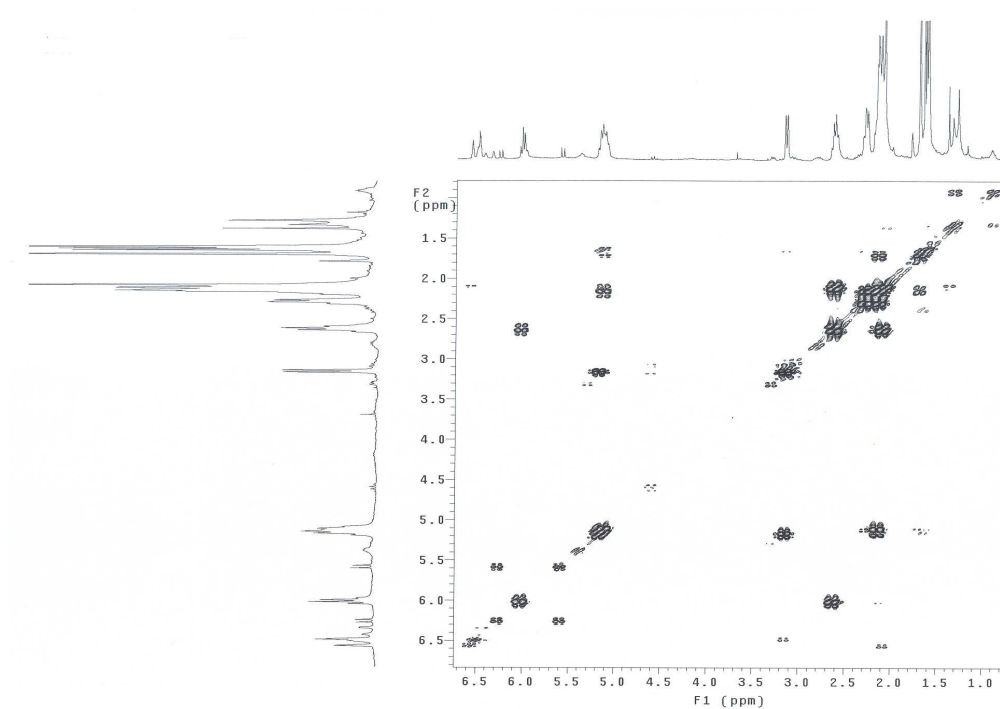


Fig. 20. gDQCOSY spectrum of compound 3 in CDCl₃.

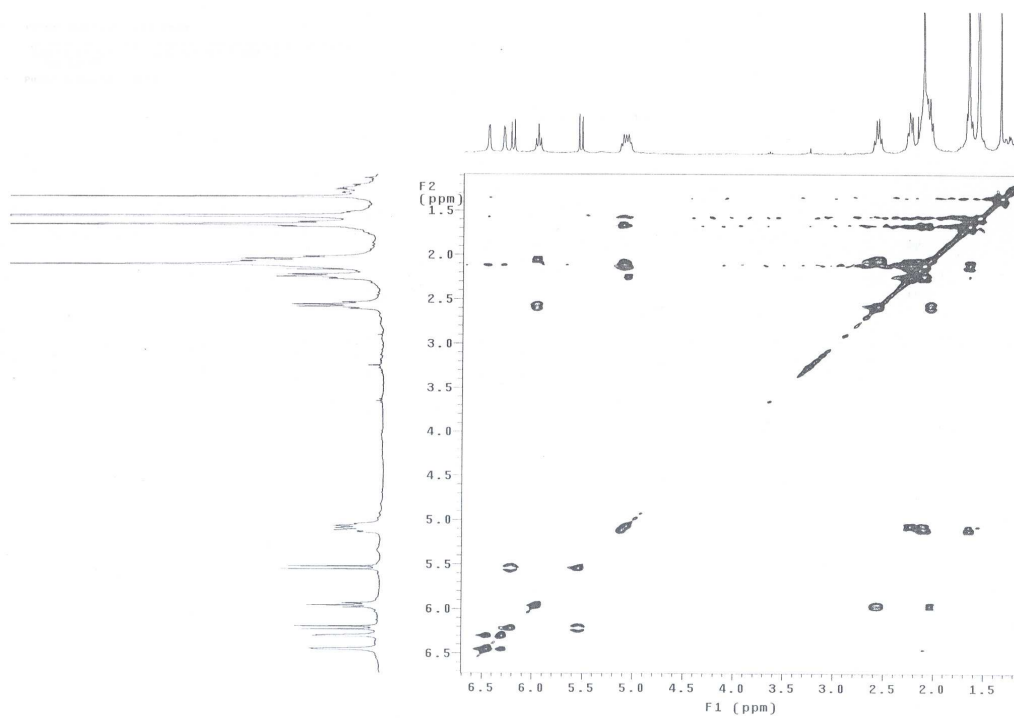


Fig. 21. TOCSY spectrum of compound 3 in CDCl₃.

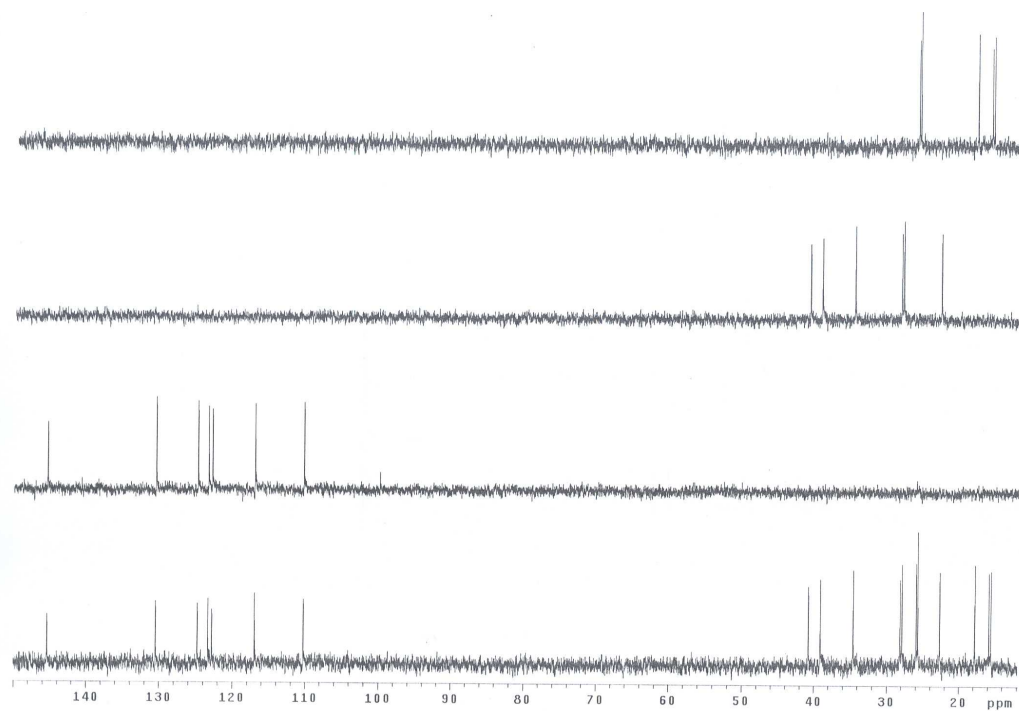


Fig. 22. DEPT spectrum of compound 3 in CDCl_3 .

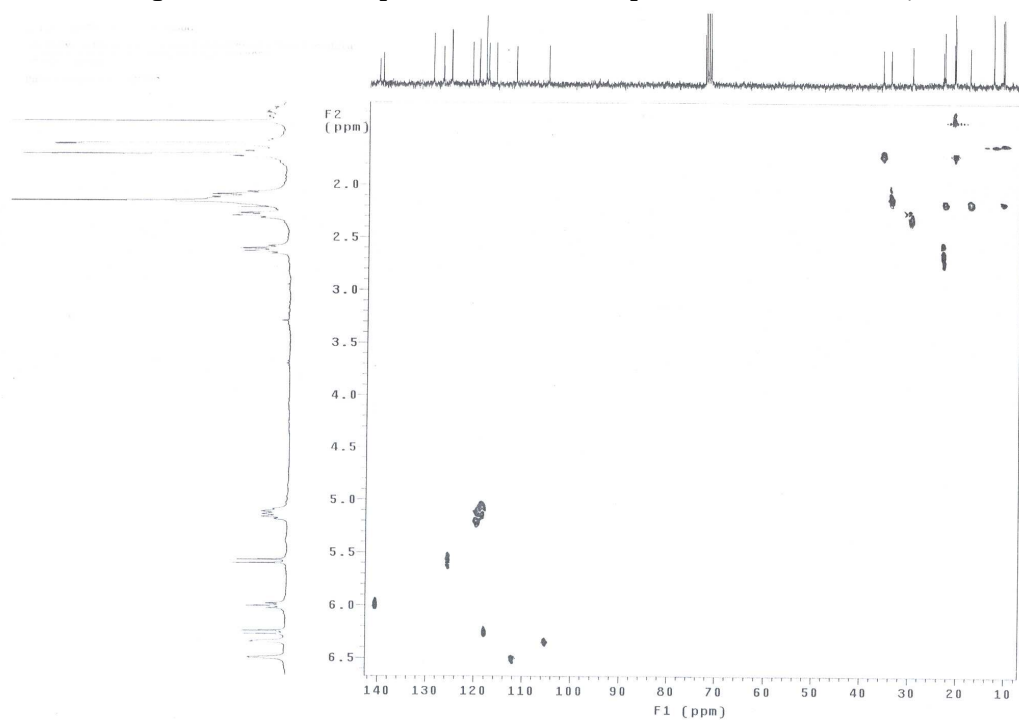


Fig. 23. HSQC spectrum of compound 3 in CDCl_3 .

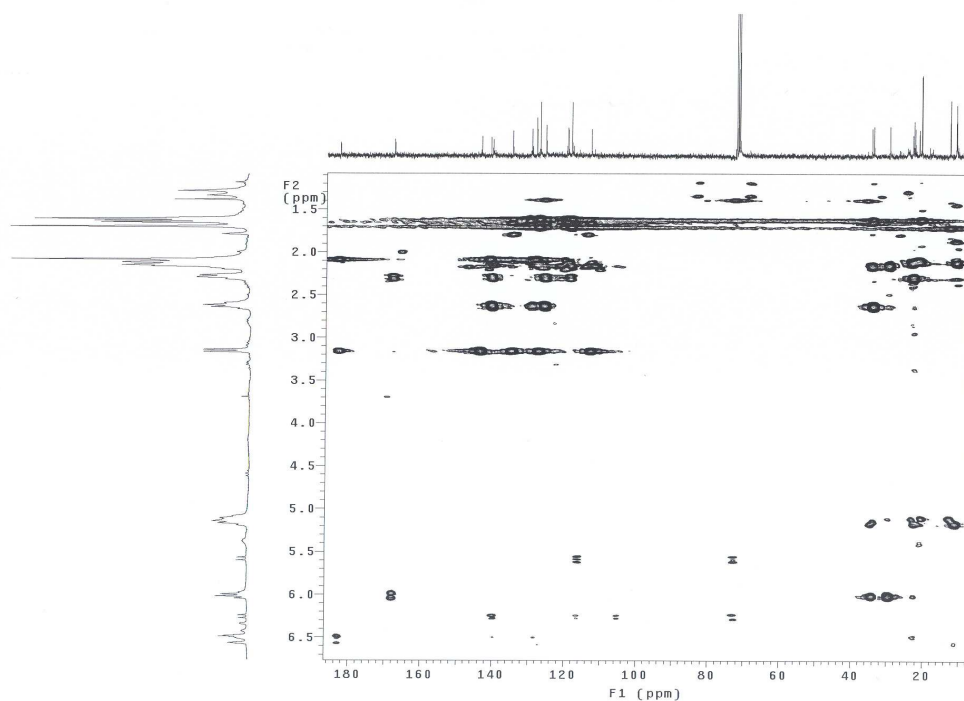


Fig. 24. gHMBC spectrum of compound 3 in CDCl_3 .

Compound **4**도 역시, 무색의 gum이었으며, HRFABMS와 ^{13}C NMR 스펙트럼 분석에 의해 분자식은 $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_5$ 로 결정되었다. Compound **1**의 spectral data와 비교할 때, compound **4**도 compound **1**과 같이 plastoquinone analog로 보여졌다. 그러나 compound **1**과 가장 큰 차이점은 ^{13}C NMR spectrum에서 compound **1**의 C-2와 C-3의 이중결합 signal들이 산화된 tertiary 탄소 (δ 88.8), quaternary 탄소 (δ 74.4)에 의해 치환되었다는 것이다. 이러한 변화는, C-2 와 C-1' 사이에 새로운 cyclic ether bond로 연결된 benzofuran ring을 도입함으로써 수용되었다. 이러한 해석은 인접한 수소와 탄소간의 long-range correlations, 즉, δ 4.52 의 H-2와 δ 152.7의 C-1' 사이의 HMBC correlation으로도 증명되었다. Compound **4**의 구조에 대한 확인과 수소, 탄소의 NMR assignment는 ^1H COSY, TOCSY, HSQC, 그리고 HMBC 실험결과로 이루어졌다. 고자장에 존재하는 다섯 개의 methyl 수소뿐만 아니라 δ 6.43 (1H, d, $J=2.1\text{Hz}$), 6.32 (1H, d, $J=2.1\text{Hz}$), 5.21 (1H, t, $J=7.2\text{Hz}$), 그리고 4.52에 존재하는 수소와 oxygenated 탄소들을 포함하여 저자장 탄소들 사이에 나타나는 long-range correlation들은 2,3-dihydrobenzofuran ring과 다른 작용기들과 그 존재위치들을 확인하는데 특히 도움이 되었다. 따라서 compound **4**의 구조는 10-(2,3-dihydro-5-hydroxy-7-methyl-1-benzofuran-2-yl)-10-hydroxy-6-methyl-2-(4-methyl-3-pentenyl)-(2E,6E)-undecadienoic acid)로 확실하게 결정되었다 (Fig. 25-31).

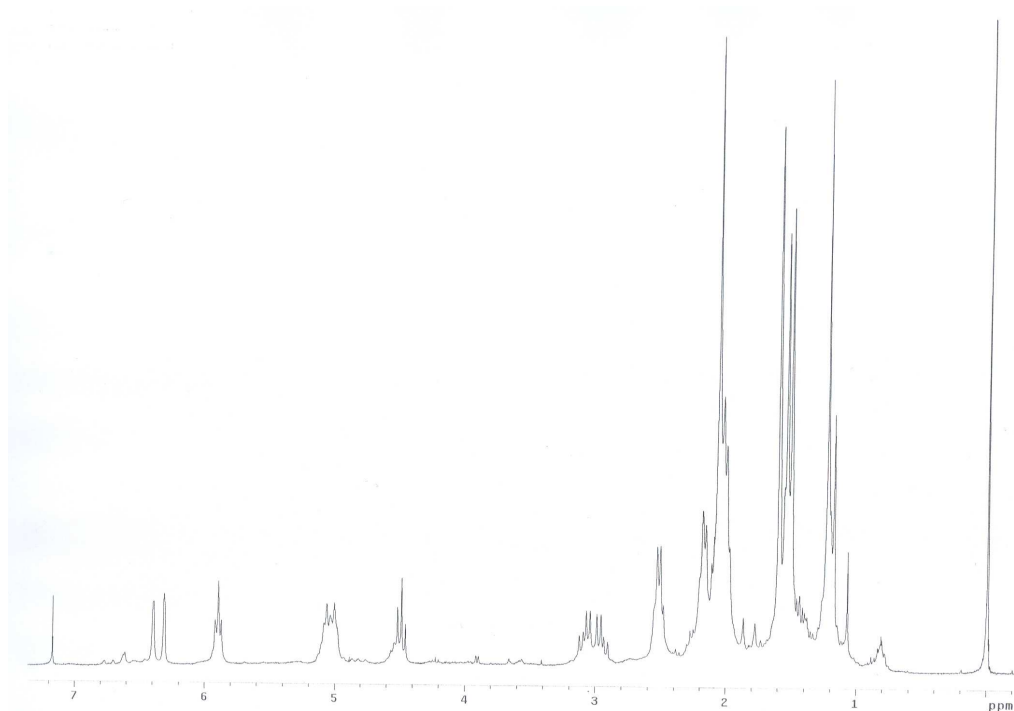


Fig. 25. ^1H NMR spectrum of compound 4 in CDCl_3 .

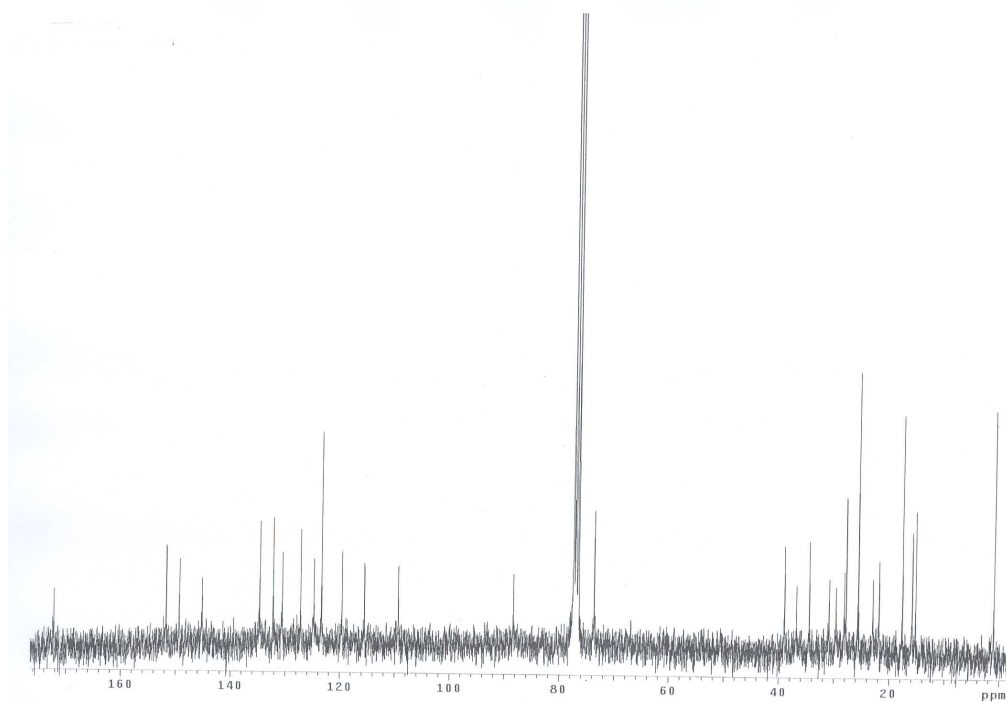


Fig. 26. ^{13}C NMR spectrum of compound 4 in CDCl_3 .

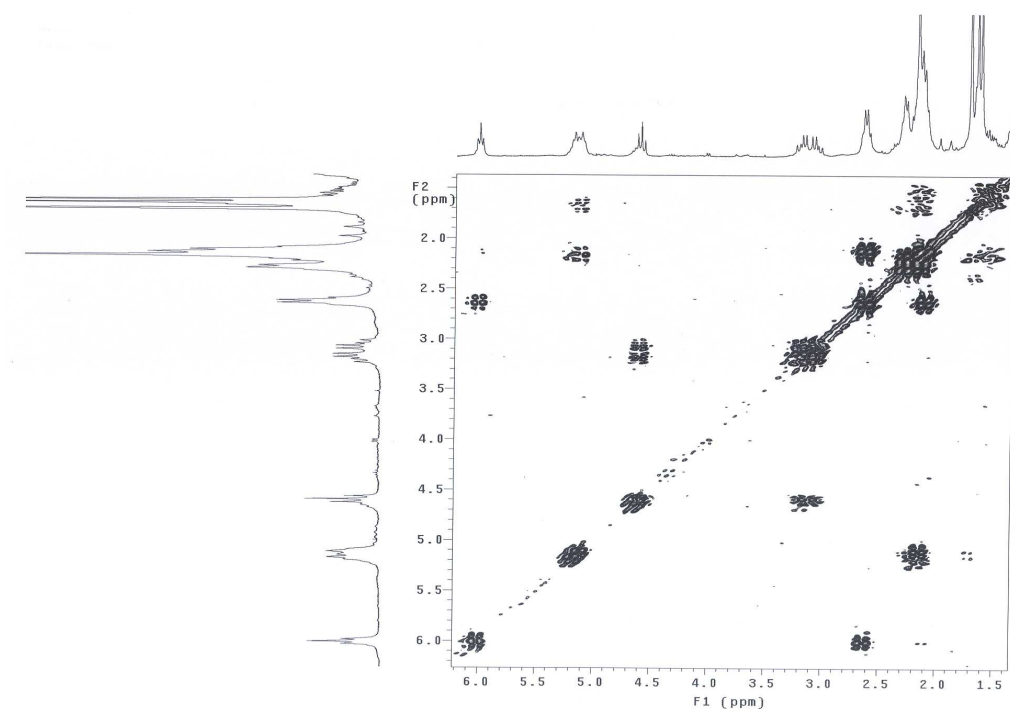


Fig. 27. gDQCOSY spectrum of compound 4 in CDCl_3 .

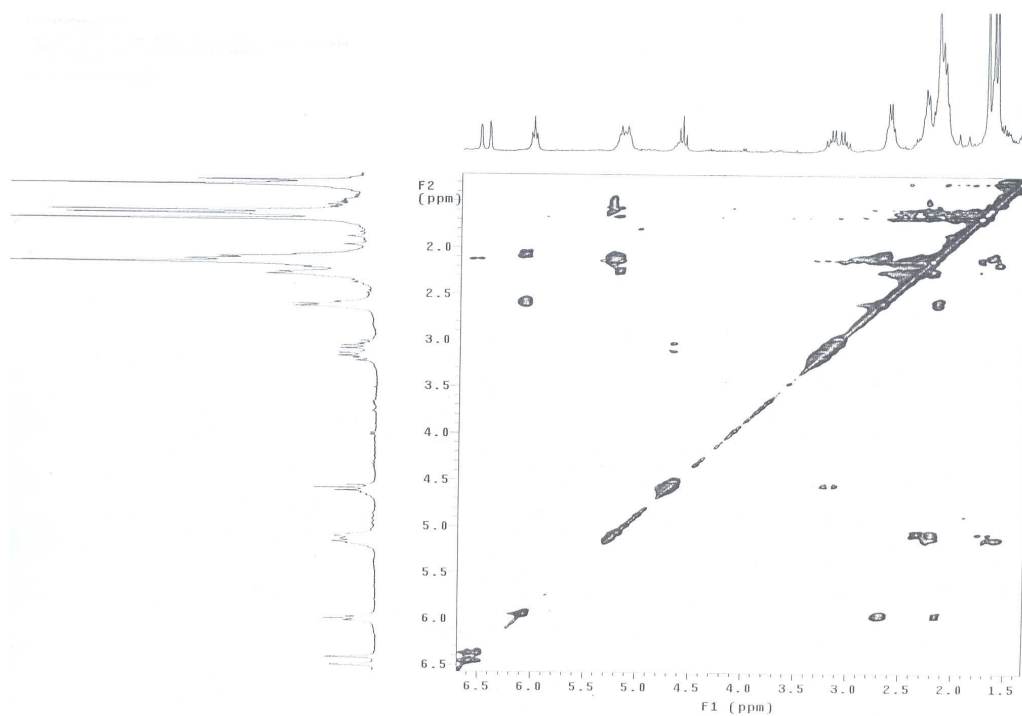


Fig. 28. TOCSY spectrum of compound 4 in CDCl_3 .

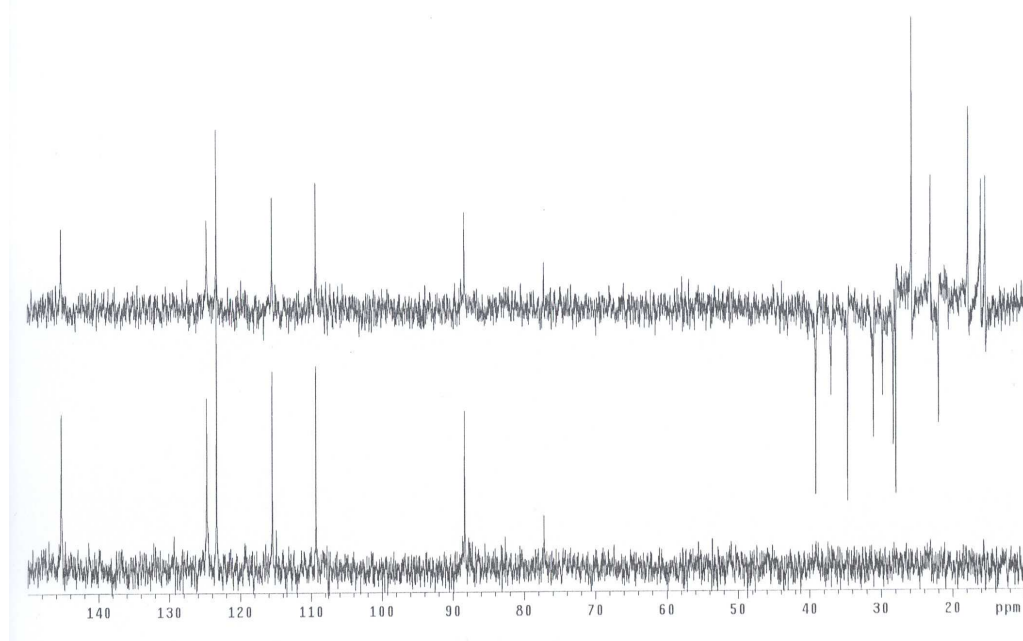


Fig. 29. DEPT spectrum of compound 4 in CDCl_3 .

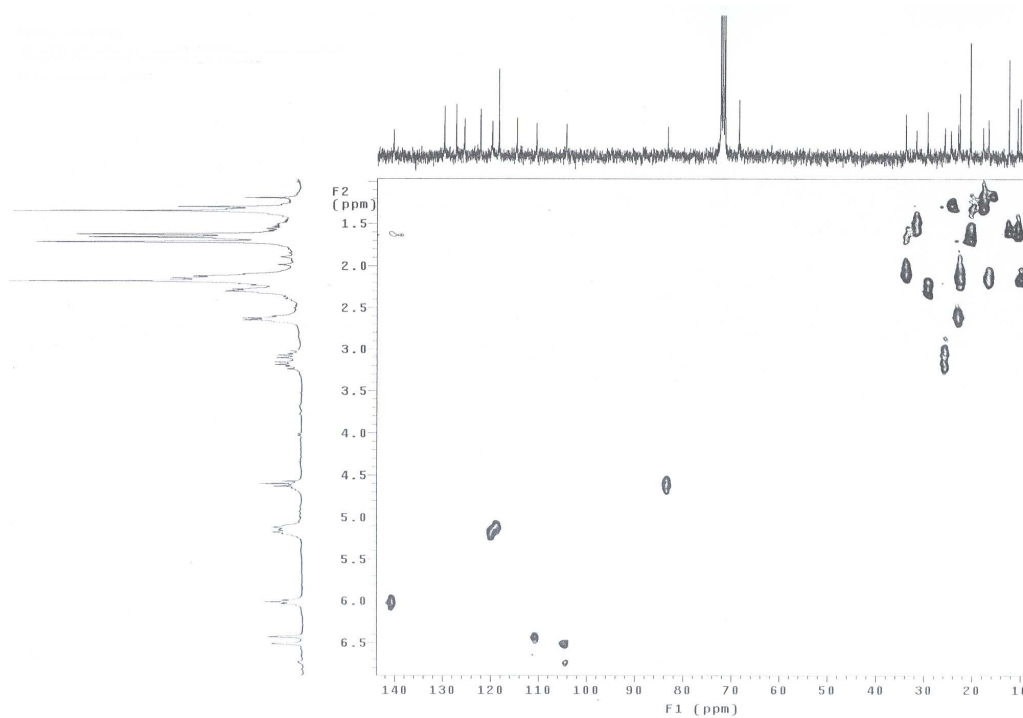


Fig. 30. HMQC spectrum of compound 4 in CDCl_3 .

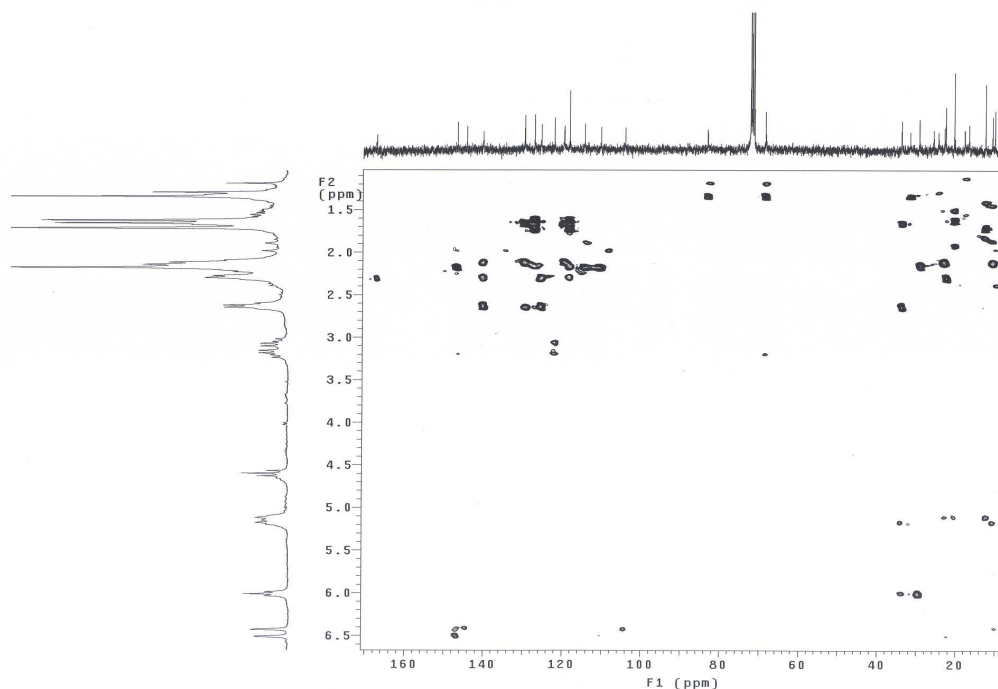


Fig. 31. gHMBC spectrum of compound 4 in CDCl_3 .

Compound 5 또한 무색의 gum이며, HRFABMS와 ^{13}C NMR 분석에 의해 분자식이 $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_5$ 로 compound 4와 동일하였다. Compound 5의 spectral data는 compound 4와 매우 흡사하였다. 그러나 ^{13}C NMR data에서 몇몇 뚜렷한 차이점을 찾을 수 있다. Compound 4의 δ 88.8에서의 methine carbon signal은 δ 69.4의 고자장으로 이동된 반면, compound 4의 δ 74.4에서의 quaternary carbon signal은 δ 78.9의 저자장으로 이동하였다. 그리고 compound 5의 aromatic ring 부분의 ^{13}C NMR signal은 compound 4의 것과 비교하면 약간의 차이가 존재한다. 또, ^1H NMR에서 compound 4의 δ 4.52 (1H, dd, 9.3, 8.3)에 나타난 H-2 signal이 δ 3.76 (1H, dd, 7.7, 5.9)의 고자장 signal로 대체된 점도 발견된다. 이러한 차이점과 분자식을 함께 고려할 시, C-3과 C-1' 사이에 산소원자로 연결된 3,4-dihydro-2H-1-benzopyran ring의 존재가 설명되어 질 수 있었다. 이 화합

물 acetylation 시켰을 때 δ 3.76에 나타났던 H-2의 signal이 δ 5.05 (1H, t, 5.4)의 저자장으로 이동되는 것이 관찰되어 C-2에는 hydroxy기가 자유로운 상태로 존재함이 확인되어 이러한 해석을 지지하였다. 따라서 compound **5**는 9-(3,4-dihydro-2,8-dimethyl-6-hydroxy-2H-1-benzopyran-2-yl)-6-methyl-2-(4-methyl-3-pentenyl)-(2E,6E)-nonadienoic acid로 확실하게 결정되었다 (Fig. 32-38).

Compound **4**와 **5**는 C-2와 C-3에 두개의 비대칭적 탄소를 가지고 있다 이들의 stereochemistry를 결정하기 위해서 NOESY 실험을 실시하였다. Compound **5**의 경우, H-2 (δ 3.73)가 H-1 (δ 2.90, 2.62), H-4 (δ 1.46), H-20 (1.23)과 강한 correlation을 보였다. 그리고 δ 1.23의 H-20와 δ 2.62의 H-1사이에도 강한 correlation이 발견되어 H-1 β (δ 2.62)와 H-20이 각각 axial로 서로 같은 orientation을 가지고 있으며 H-2와 H-1 α (δ 2.90) 및 H-4는 모두 equatorial orientation을 갖는다는 것이 확인되었다. 따라서 이 화합물의 relative configuration은 (2S*,3S*)로 결정되었다 (Fig. 39). Compound **4**의 NOESY 실험으로부터는 open-chain인 C-3에 위치하는 치환체의 free rotation 때문에 중요한 correlation 정보를 얻는데 실패하였다. 하지만 compound **4**는 **5**와 매우 유사한 구조를 가지기 때문에 같은 configuration을 가질 것으로 추측되나 확인되지는 않았다. 지금까지 갈조류 특히 모자반에서 많은 plastoquinone 유도체들이 분리되었지만 compound **4**와 **5**는 처음으로 분리된 신규 화합물들로서 2,3-dihydrobenzofuran 또는 3,4-hydrobenzopyran ring을 가지고 있는 것이 매우 특징적이다.

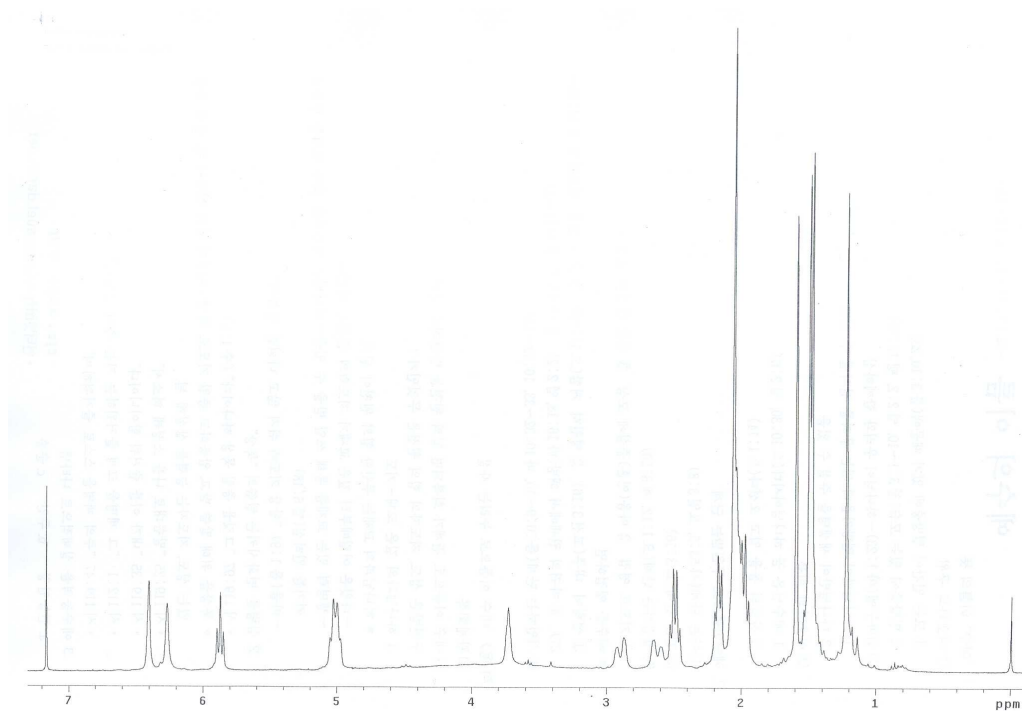


Fig. 32. ^1H NMR spectrum of compound 5 in CDCl_3 .

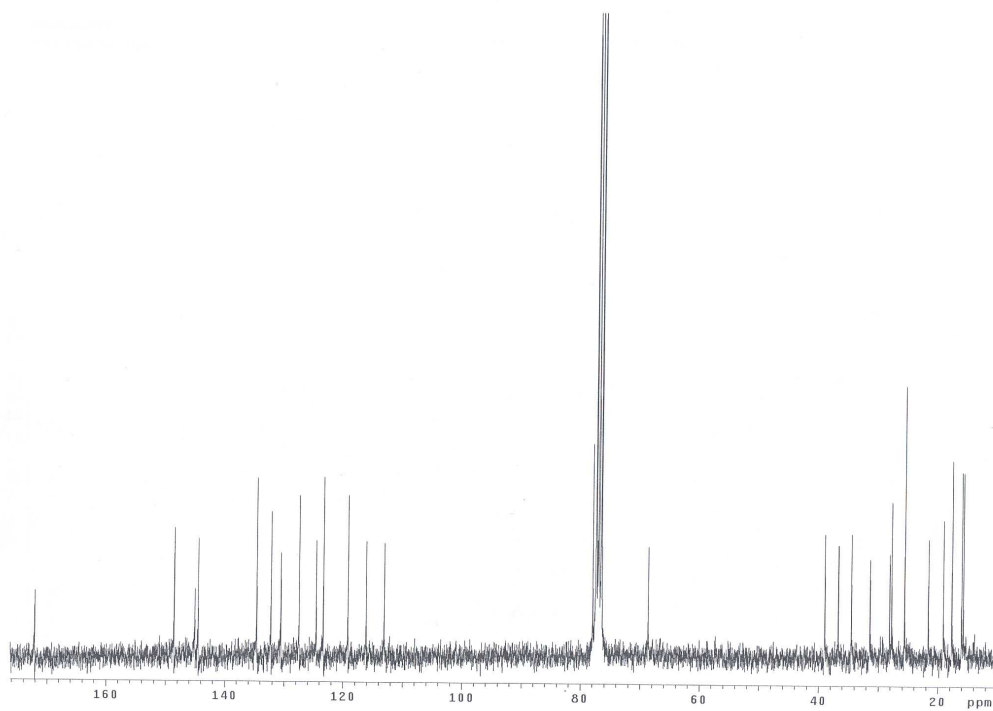


Fig. 33. ^{13}C NMR spectrum of compound 5 in CDCl_3 .

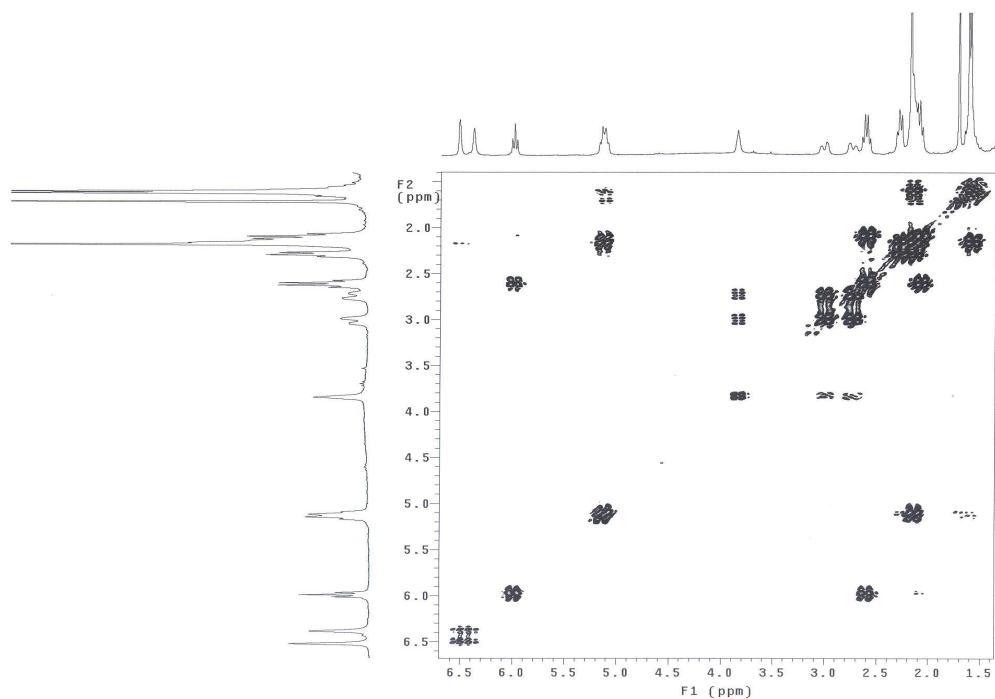


Fig. 34. gDQCOSY spectrum of compound 5 in CDCl_3 .

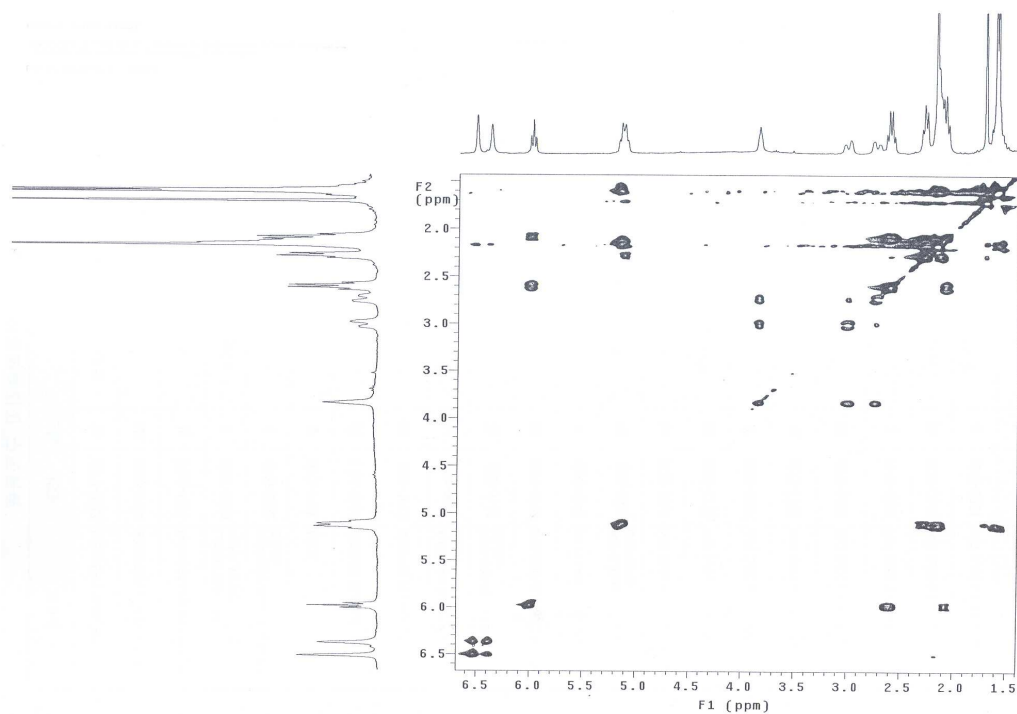


Fig. 35. TOCSY spectrum of compound 5 in CDCl_3 .

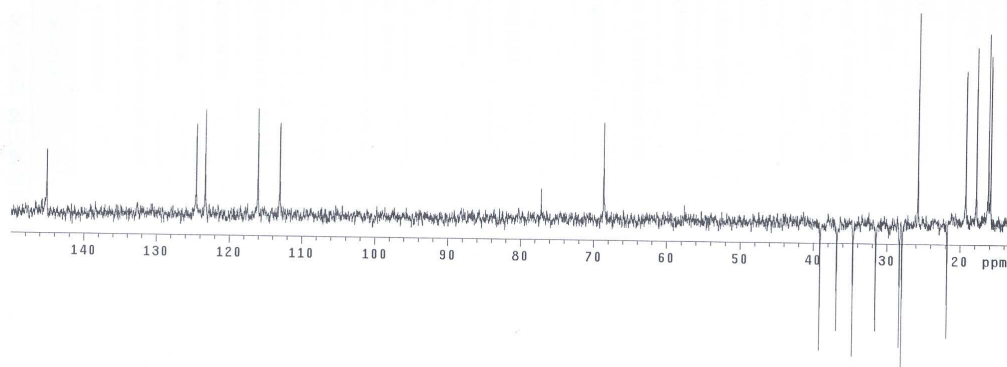


Fig. 36. DEPT spectrum of compound 5 in CDCl_3 .

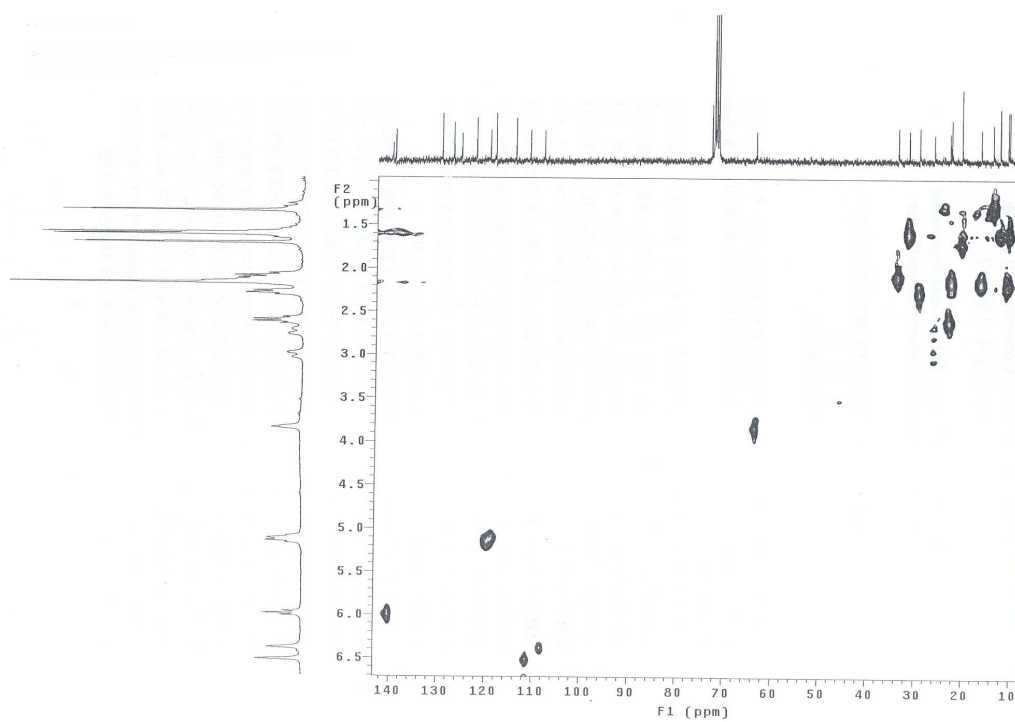


Fig. 37. HMQC spectrum of compound 5 in CDCl_3 .

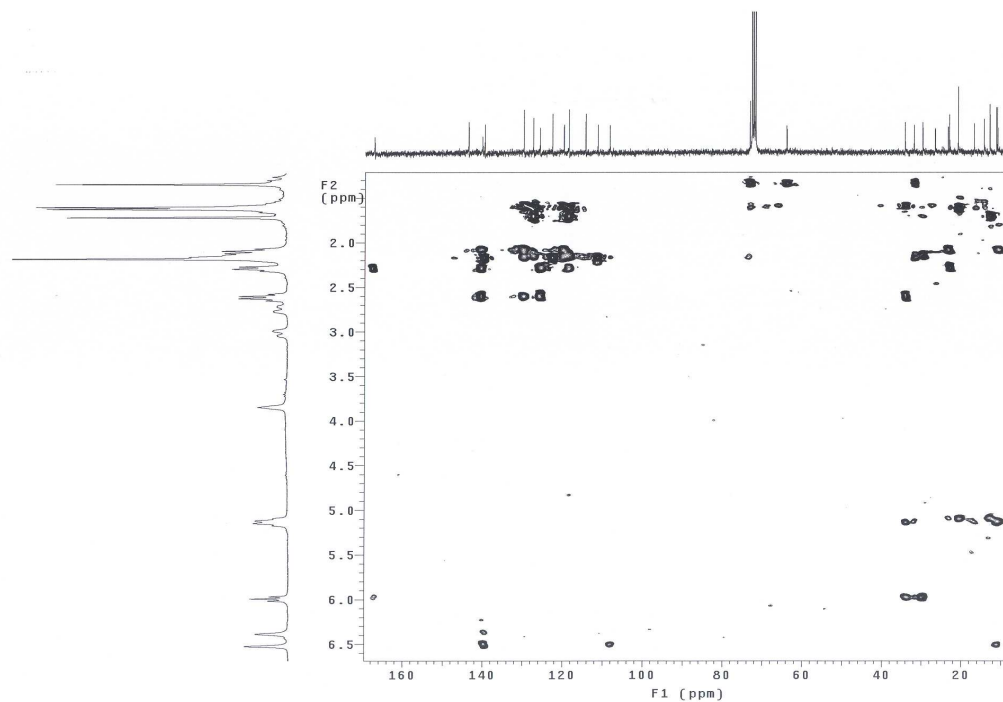


Fig. 38. gHMBC spectrum of compound 5 in CDCl_3 .

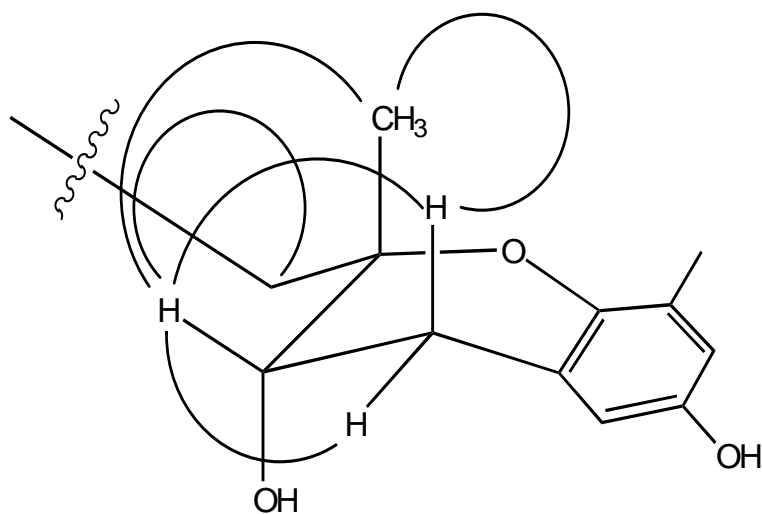


Fig. 39. Key NOESY correlations for compound 5.

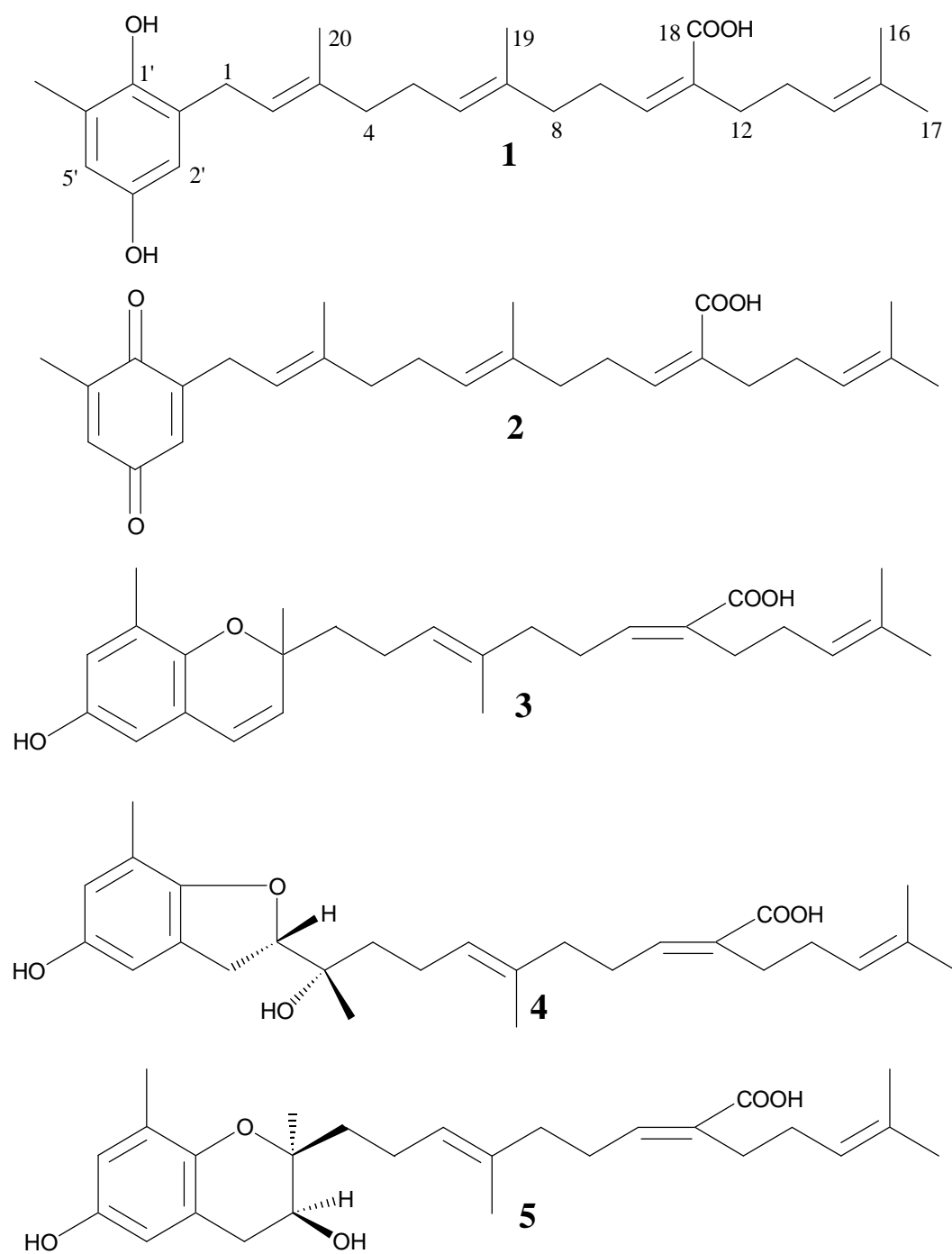


Fig. 40. Chemical Structure of Compounds 1 - 5.

이러한 5개의 plastoquinone 유도체들 외에도 3개의 norisoprenoid 유도체들이 분리되었다. Compound **6**은 무색의 gum으로 분리되었으며, ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) 측정 결과, δ 1.28 (3H, s, axial), 1.31 (3H, s) 그리고 1.59 (3H, s, axial)에서 3개의 methyl peak와 δ 1.28 (1H, dd, $J = 9.8$ and 9.8 Hz, H-5), 1.42 (1H, dd, $J = 11.7$ and 11.7 Hz, H-7), 2.00 (1H, ddd, $J = 2.2$, 4.3 and 13.0 Hz, H-5), 2.46 (ddd, $J = 2.2$, 3.9 and 11.7 Hz, H-7), 4.09 (1H, m, H-6)에서 하나의 carbinol proton과 그에 인접한 두개의 methylene peaks의 존재를, δ 5.77 (1H, s, H-3)에서 한 개의 이중결합에 관여하는 proton peak를 확인할 수 있었다. 또한 ^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD)에서 δ 113.59 (C-3), 173.77 (C-2) 그리고 183.67 (C-3a)에서 α , β -unsaturated- γ -lactone group에 해당되는 특징적인 peak를 확인할 수 있었고 δ 65.21 (C-6)과 88.49 (C-7a)에서 oxygenated carbon의 peak가 나타나는 것으로 보아 이 화합물이 α , β -unsaturated- γ -lactone group과 carbinol carbon과 2개의 methylene carbon 그리고 3개의 tertiary methyl group으로 구성된 2환 구조임을 추정할 수 있었다. 특히 NOESY spectrum 결과 (**Fig. 45**), H-6 (δ 4.12, 1H, tt, $J = 4.1$ and 12.3 Hz), H-10 (δ 1.26, 3H, s, axial), H-8 (δ 1.59, 3H, s, axial)이 correlation하고 있는 것으로 보아 이 화합물이 (+)-(6S, 7aS)-epiloliolide임을 추정할 수 있었다. 화합물 **6**을 문헌치와 비교하기 위하여 CDCl_3 용매를 이용하여 다시 ^1H -NMR를 측정하였으며 구조가 동일함을 재확인할 수 있었다 (**Fig. 41-44**).

Compound **7** 역시 무색의 gum으로 분리되었으며, ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) 측정 결과, compound **6**과 유사한 peak pattern을 보이는 것으로 보아 이 화합물 역시 α , β -unsaturated- γ -lactone group과 carbinol carbon과 2개의 methylene carbon 그리고 3개의 tertiary methyl group으로 구성된 2환 구조임을 추정할 수 있었다. 정확한 구조를 확인하기 위해 이차원적 NMR 실험을 수행하였으며 그 결과 compound **6**과는 다른 NOESY correlation을 나타내었다

(Fig. 46). 특히 compound **6**에서 나타났던 H-6 (δ 4.30, 1H, br quin, J = 3.4 Hz)의 methyl groups [H-10 (δ 1.78, 3H, s, equatorial), H-8 (δ 1.47, 3H, s, axial)]과의 특징적인 correlation은 사라진 것으로 보아, 이 화합물은 (-)-(6R,7aS)-loliolide임을 추정할 수 있었다. Compound **6**을 문헌치와 비교하기 위하여 CDCl_3 용매를 이용하여 다시 ^1H NMR를 측정하였으며 구조가 동일함을 재확인할 수 있었다.

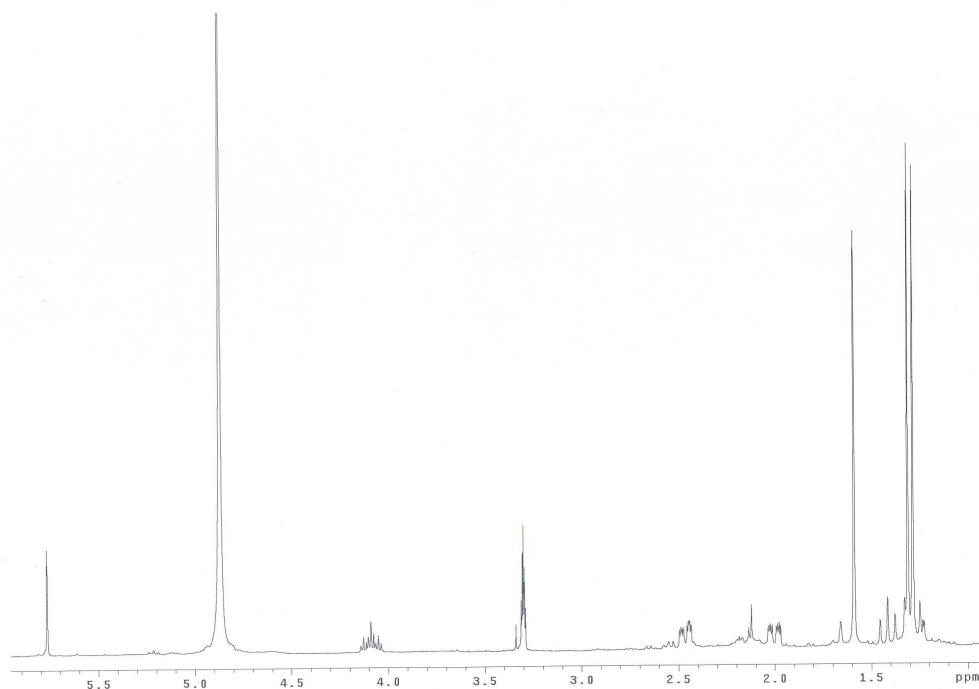


Fig. 41. ^1H NMR spectrum of compound 6 in CD_3OD .

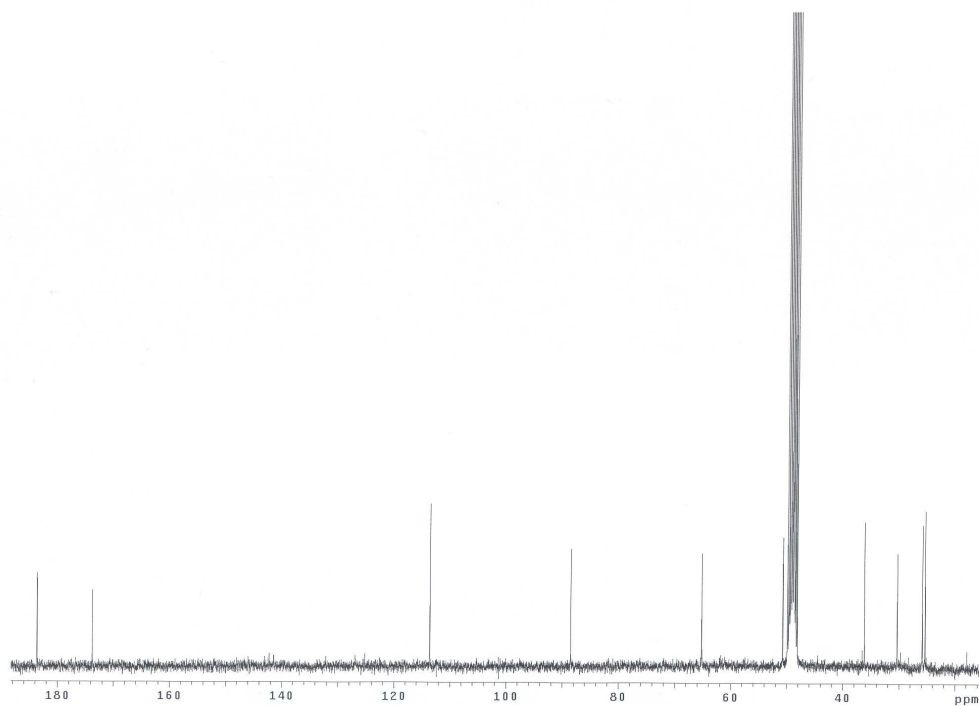


Fig. 42. ^{13}C NMR spectrum of compound 6 in CD_3OD .

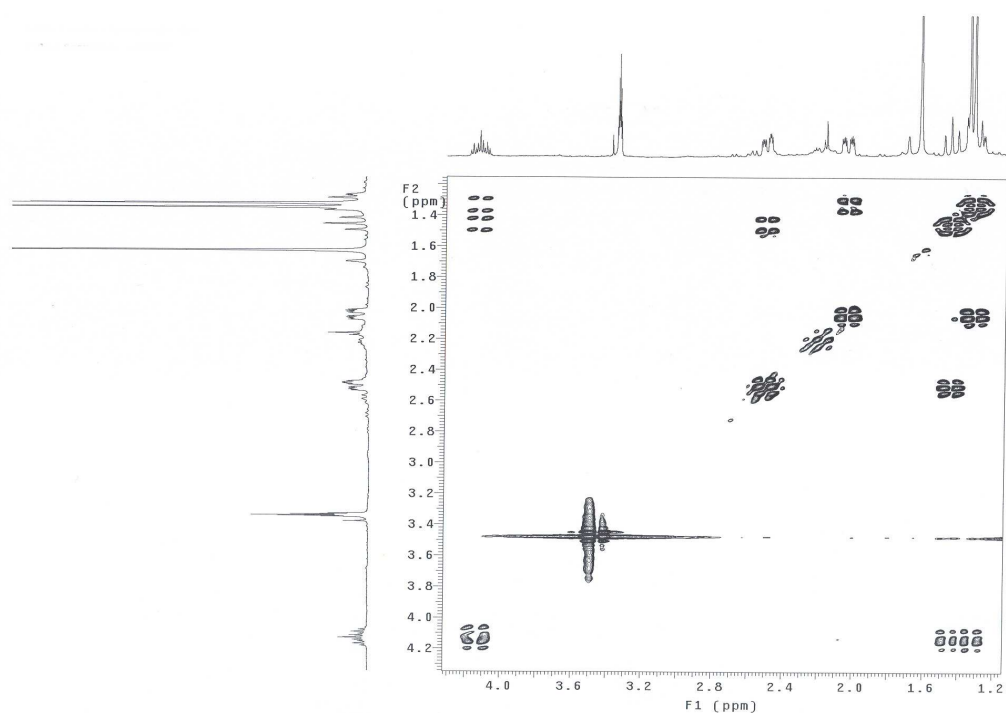


Fig. 43. gDQCOSY spectrum of compound 6 in CD₃OD.

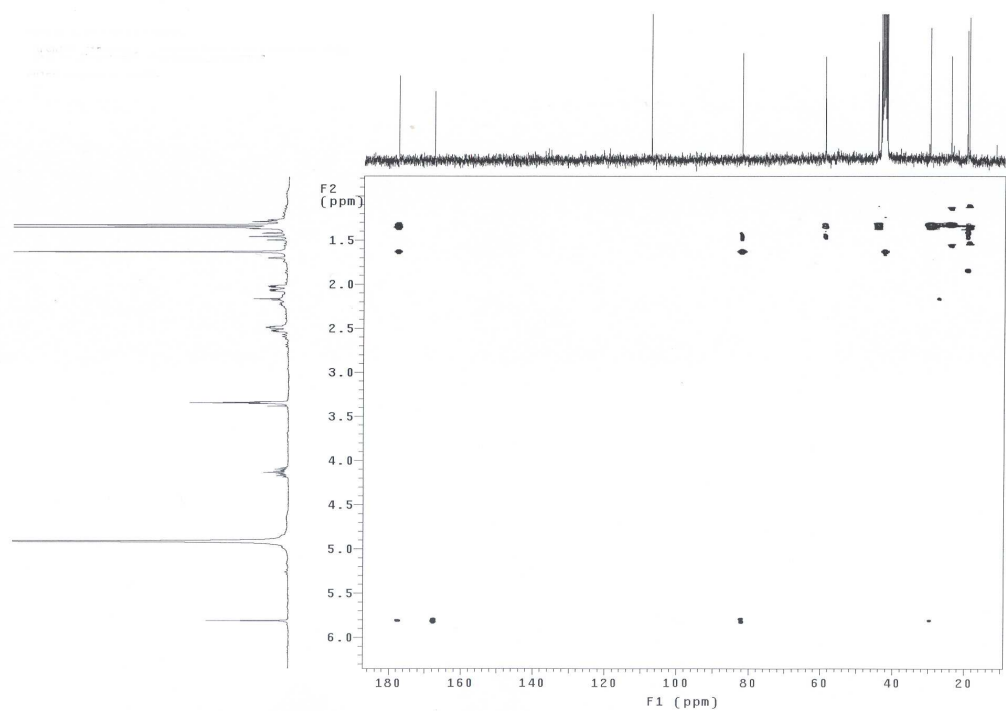


Fig. 44. HMBC spectrum of compound 6 in CD₃OD.

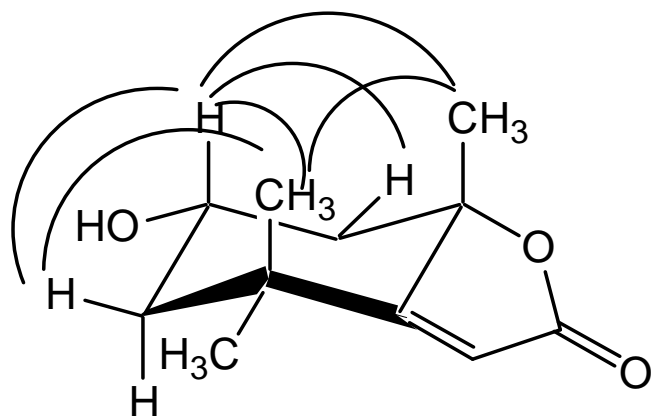


Fig. 45. NOESY Correlation of key protons for compound 6.

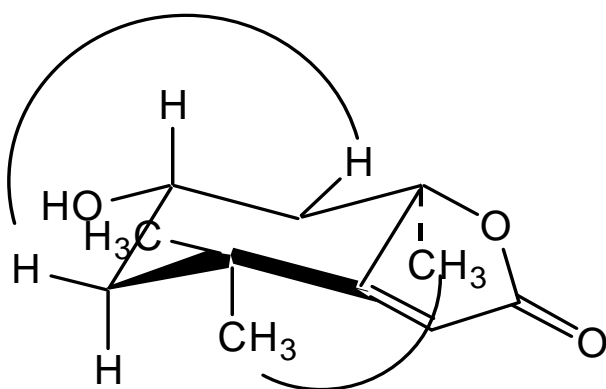


Fig. 46. NOESY Correlation of key protons for compound 7.

Compound **8**은 무색의 gum으로 분리되었으며, ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) 측정 결과, δ 1.26 (3H, s, H-9), 1.47 (3H, s, axial, H-8), 1.50 (1H, dd, J = 14.3 and 3.6 Hz, H-7), 1.75 (1H, dd, J = 13.8 and 3.9 Hz, H-5), 1.78 (3H, s, equatorial, H-10)에서 5개의 methyl group의 peak를 확인할 수 있었으며, δ 5.86 (1H, s, H-8)에서 한 개의 이중결합에 관여하는 특징적인 proton peak를 확인할 수 있었다. 또한 ^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD)에서 δ 100.8 (C-8), 209.3 (C-7) 및 118.3 (C-6)에서 특징적인 allene group의 존재도 확인할 수 있었고, δ 197.9 (C-9)과 170.3 (C-14)에서 carbonyl group의 peak를 확인할 수 있었으며 2개의 methylene peaks (δ 45.2 & 45.1)를 확인할 수 있었다. 측정치를 문헌치와 비교한 결과 화합물 **8**의 구조가 apo-9'-fucoxanthinone임을 확인할 수 있었다 (Fig. 47-50).

Compound **6**과 **7**은 육상식물에서 몇 번 발견되었으나 해양생물에서는 발견된 예가 매우 드물어 갈조류 *Cystophora moniliformis*와 해양 연체동물에서 각각 한번 분리되었다. 또한 compound **8**은 특이한 allene group을 가지고 있는 대사물질로서 해양 미세조류에서 한번 분리된 경우를 제외하고 이 번에 처음으로 부산 연안에서 채집한 갈조류 지충이에서 발견되었다. 이와 같이 compound **6**, **7** 및 **8**은 해양 천연물로는 매우 드물게 발견된다고 할 수 있으나 이 화합물을 함유하고 있는 갈조류인 지충이는 우리나라 연안에 풍부하게 존재하는 종이기 때문에 이 화합물들을 손쉽게 분리, 정제할 수 있을 것이다. Compound **7**과 **8**은 각각 면역억제활성과 세포독성이 보고된 바 있으며 해양에서 드물게 발견되는 생태학적인 특성을 감안할 때 매우 흥미있는 활성이 기대된다. 따라서 추후 추가적으로 다량의 화합물을 분리한 후 이들에 대한 다양한 활성을 검색할 예정이다.

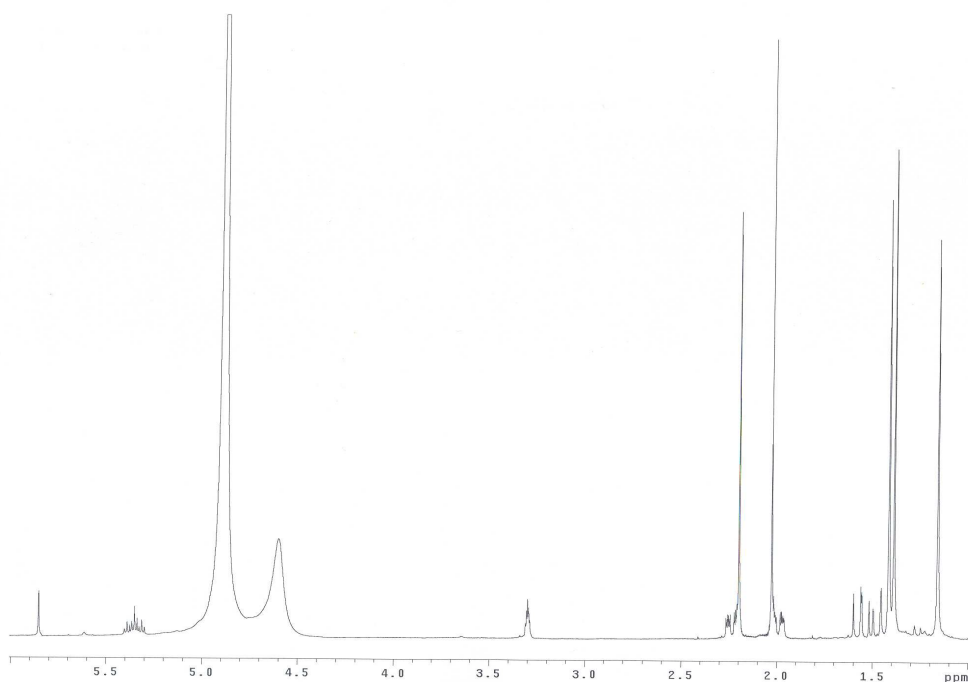


Fig. 47. ^1H NMR spectrum of compound 8 in CD_3OD .

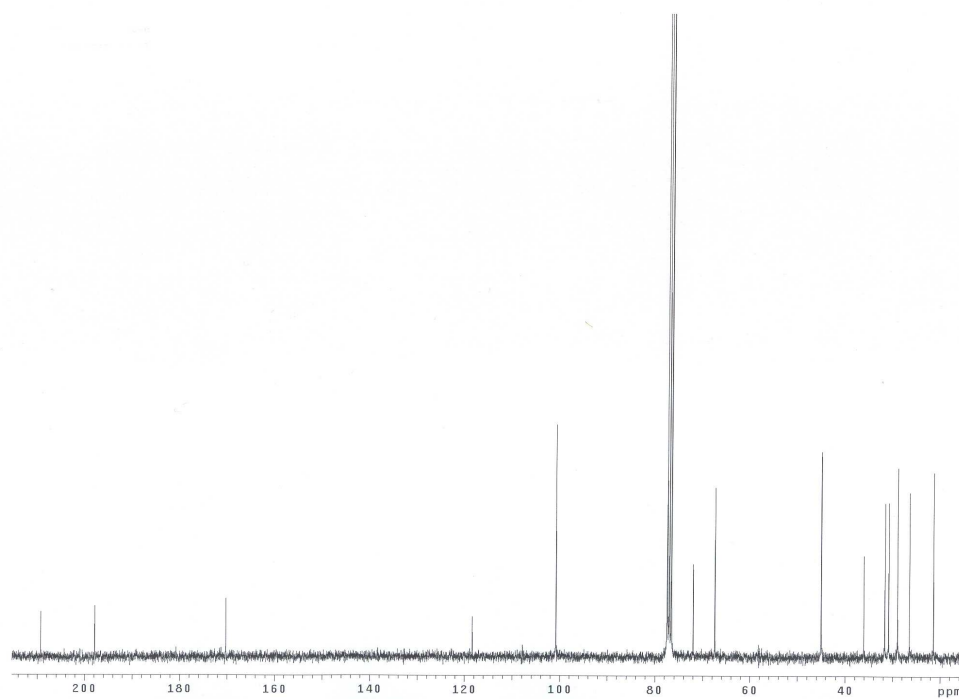


Fig. 48. ^{13}C NMR spectrum of compound 8 in CD_3OD .

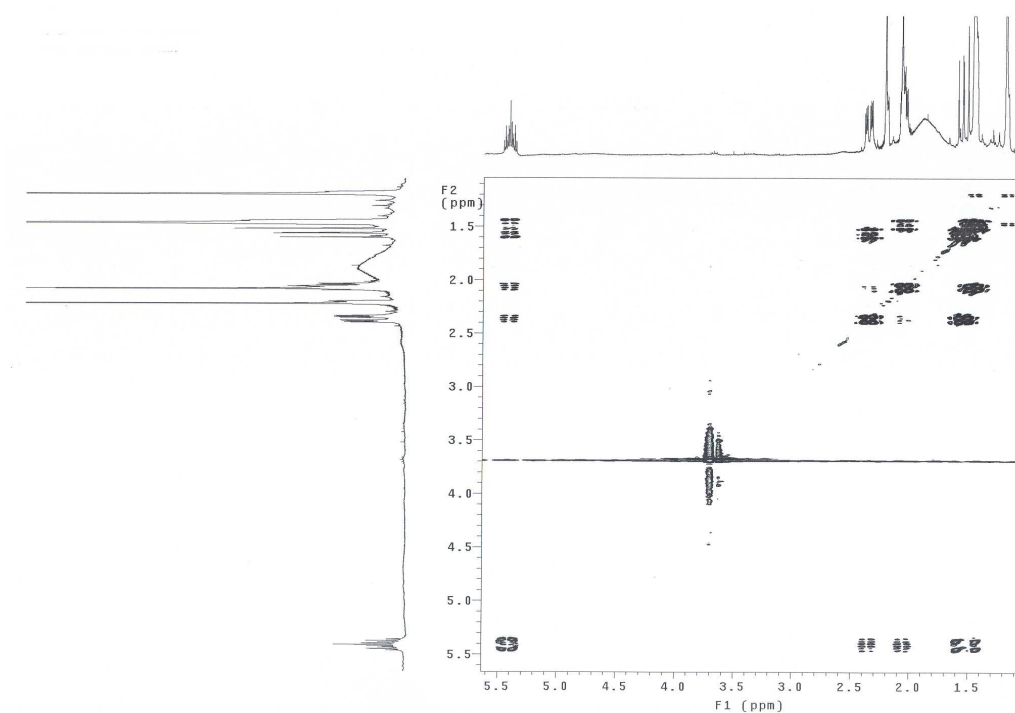


Fig. 49. gDQCOSY spectrum of compound 8 in CD₃OD.

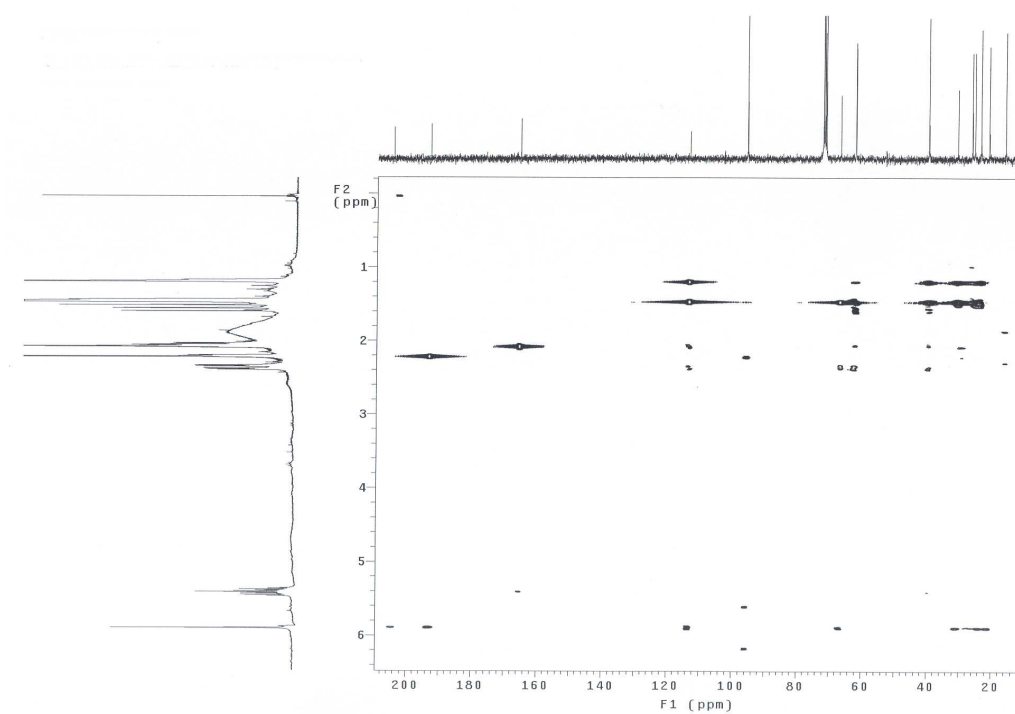


Fig. 50. HMBC spectrum of compound 8 in CD₃OD.

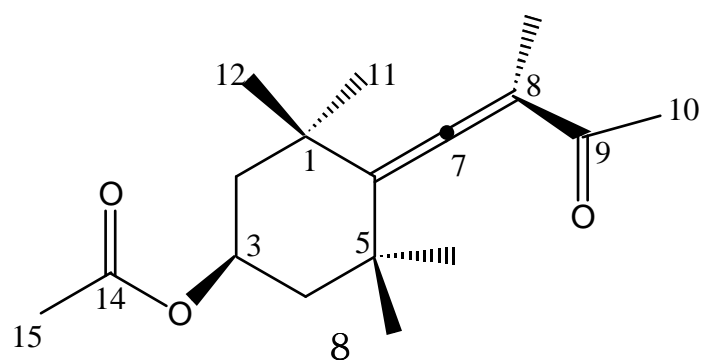
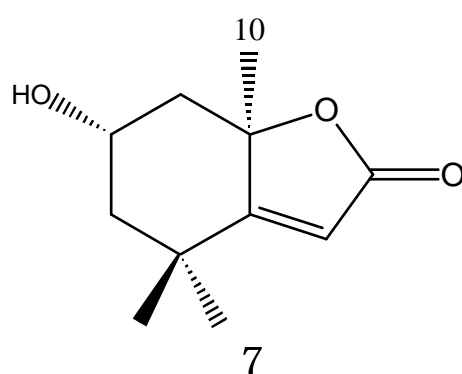
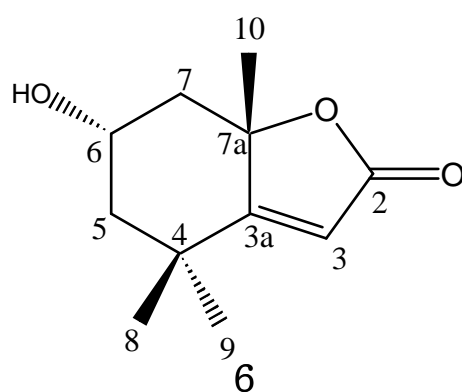


Fig. 51. Chemical Structure of Compounds 6 – 8.

3-2. 항산화 활성

(1) DPPH radical 소거 활성

1) 지층이의 분획별 활성

지층이의 혼합 추출물은 모두 혼합한 후 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H₂O fraction을 얻었다. 이들 fraction 각각을 DPPH radical 소거활성을 검색하였다. 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 85% aq. MeOH층이 92.0% 로 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 가장 강력한 radical 소거 활성을 보였고, *n*-BuOH, H₂O, 그리고 *n*-hexane fraction은 각각 50.0%, 34.8%, 9.4% 순으로 감소하는 효과를 보였다 (**Fig. 52**). 이 결과는 강한 항산화제로 알려져 있는 L-ascorbic acid가 보인 97.3%와 비교 시에도 전혀 뒤지지 않은 효과임을 알 수 있었고 합성 항산화제인 BHT의 81.9%, BHA 87.9%보다도 좋은 효과를 보였다. 따라서 85% aq. MeOH fraction 안에 L-ascorbic acid같은 뛰어난 항산화물질이 들어있을 것이라 추측할 수 있었다.

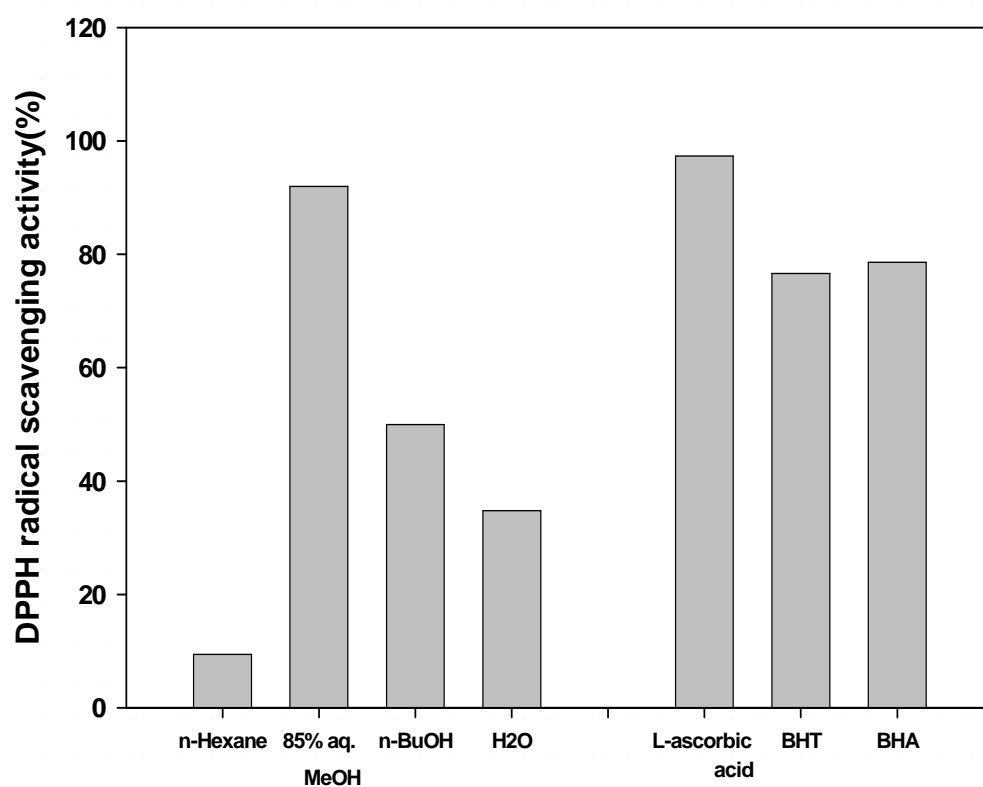


Fig. 52. DPPH radical scavenging effect of *Sargassum thunbergii* fractions (100 $\mu\text{g/ml}$).

2) Compound 1-5 의 활성

지층이의 85% aq. MeOH fraction에서 분리한 compound 1-5의 DPPH radical 소거 활성은 다섯 개의 화합물 모두 강력한 소거능력을 보였다. 이는 합성 항산화제인 BHT의 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 보다 모두 좋고, 특히 compound 3이 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 가장 우수했다 (Fig. 53). 다른 화합물인 compound 1, compound 2, compound 4, compound 5는 각각 26, 27, 30, 31 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항산화 능력을 보였다. 이는, 비록 L-ascorbic acid의 11.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 보다는 능력이 떨어지지만 다섯 개의 화합물 모두 강력한 항산화물질임을 확인할 수 있다 (Table 3.).

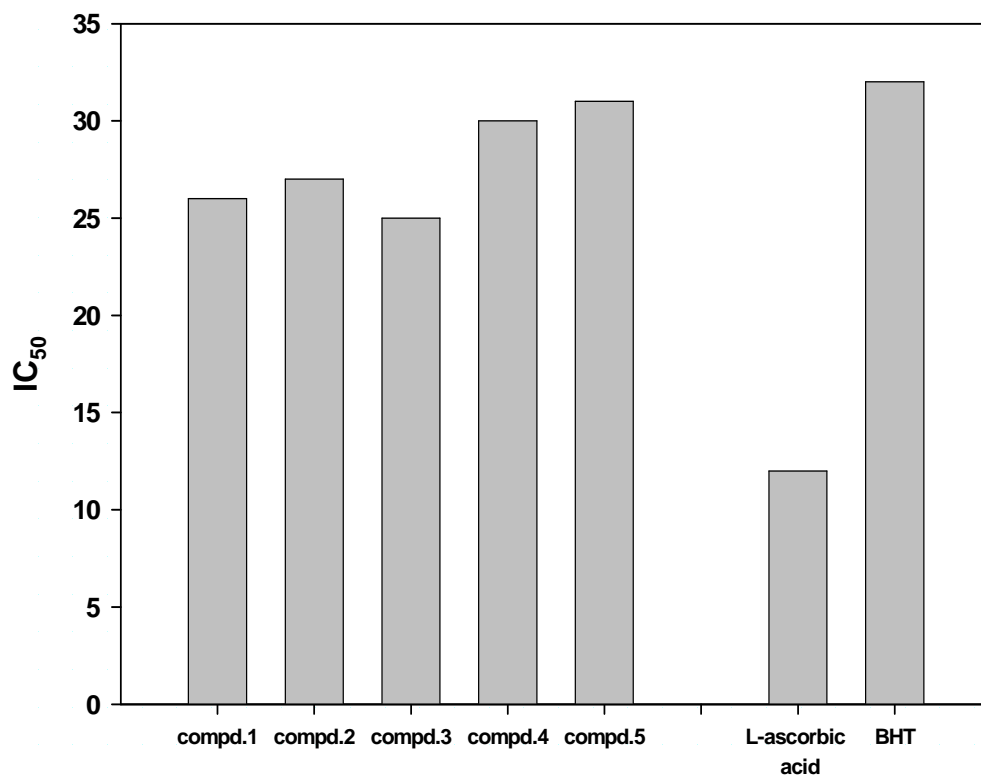


Fig. 53. DPPH radical scavenging effect of *Sargassum thunbergii* compounds 1-5.

Table 3. DPPH radical scavenging effect of *Sargassum thunbergii* compounds 1–5.

	IC ₅₀ (μg/ml)
1	26
2	27
3	25
4	30
5	31
BHT	32
L-ascorbic acid	11.4

(2) Peroxynitrite 소거 활성

1) 지층이의 분획별 활성

ONOO⁻ 소거 활성은 dihydrorhodamine123 (DHR123)의 산화되는 정도를 측정함으로써 검색하였다 (Kooy, 1994). 지층이를 분획해서 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H₂O fraction을 얻은 후, 각각의 fraction을 peroxynitrite 소거 활성을 검색하였다. 그 결과 5 µg/ml 농도에서 85% aq. MeOH층이 96.3%로 가장 강력한 소거 활성을 보였고, *n*-BuOH, *n*-hexane, 그리고 H₂O fraction은 각각 63.5%, 45.6%, 41.1% 정도의 효과를 보였다. 이러한 결과는 85% aq. MeOH가 정제되지 않은 fraction임을 감안할 시 강력한 항산화제로 알려져 있는 L-ascorbic acid가 보인 98.1%와 penicillamine이 보인 90.4% 와 비교 시에도 전혀 뒤지지 않은 효과임을 알 수 있었다 (Table 4). *n*-BuOH fraction 또한 85% aq. MeOH보다는 약간 낮았지만 강력한 항산화물질임을 알 수 있었다 (Fig. 54).

Table 4. Scavenging activity of *Sargassum thunbergii* fractions on ONOO⁻ from decomposition of SIN-1 (50 µg/ml).

Sample	Authentic ONOO ⁻ (%)
<i>n</i> -hexane fr.	45.6 ± 11.7
85% aq. MeOH fr.	96.3 ± 0.9
<i>n</i> -BuOH fr.	63.5 ± 3.9
H ₂ O fr.	41.1 ± 5.8
L-ascorbic acid	98.1 ± 0.4
Penicillamine	90.4 ± 1.1

Each data is represented as the mean ± SEM of three experiments.

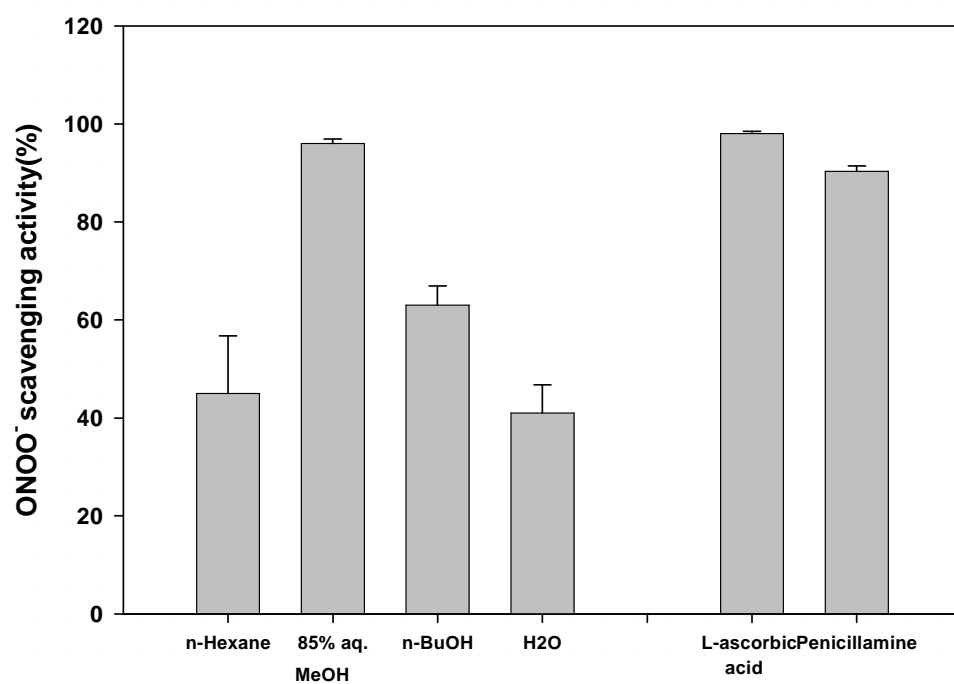


Fig. 54. Scavenging activity of *Sargassum thunbergii* fractions on authentic ONOO⁻ (50 $\mu\text{g/ml}$). Each data is represented as the mean \pm SEM of three experiments.

2) Compound 1-5 의 활성

지충이의 85% aq. MeOH fraction에서 분리한 compound 1-5의 authentic peroxyxynitrite 와 SIN-1을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다. 먼저 authentic peroxyxynitrite를 측정한 경우는 다음과 같다 (**Table 4**). 분리한 다섯 개의 화합물 모두 좋은 결과를 보였으나, 특히 compound 1의 90.3%와 compound 3의 88.1%의 결과는 대조군으로 쓰인 강력한 항산화제인 L-ascorbic acid의 98.1%와 penicillamine의 90.4%의 결과만큼이나 뛰어남을 알 수 있다 (**Fig. 55**). 그리고 morpholinosydnomine으로부터 유리된 ONOO⁻를 측정하는 SIN-1 실험에서는 compound 모두 비교적 좋은 결과를 보였으나, authentic peroxyxynitrite와는 조금은 다른 결과를 보였다. SIN-1 첨가 시에는 compound 5가 98.6%의 효과로 가장 뚜렷한 결과를 보였고, compound 2 또한 95.8%의 효과로 그 다음으로 좋은 결과를 보였다. 이는 대조군인 L-ascorbic acid의 93.5%와 penicillamine의 88.2%보다 좋은 결과임을 알 수 있었다 (**Fig. 56**). 그리고 compound 4, compound 1, compound 3은 각각 90.59%, 85.75%, 76.56%의 효과를 보였으며, 이러한 결과는 대조군보다는 조금은 낮으나 이 또한 강력한 항산화물질임을 알 수 있었다.

Table 5. Scavenging activity of *Sargassum thunbergii* compounds 1-5 on authentic ONOO^- and ONOO^- from decomposition of SIN-1 ($12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$).

	Authentic ONOO^- (%)	ONOO^- from decomposition of SIN-1 (%)
1	90.3 ± 3.6	85.8 ± 8.6
2	50.6 ± 5.6	95.8 ± 3.6
3	88.1 ± 1.6	76.7 ± 5.3
4	57.1 ± 5.8	90.6 ± 0.6
5	59.7 ± 3.8	98.6 ± 3.7
L-ascorbic acid	98.1 ± 0.4	93.5 ± 0.4
Penicillamine	90.4 ± 2.3	88.2 ± 3.5

Each data is represented as the mean \pm SEM of three experiments.

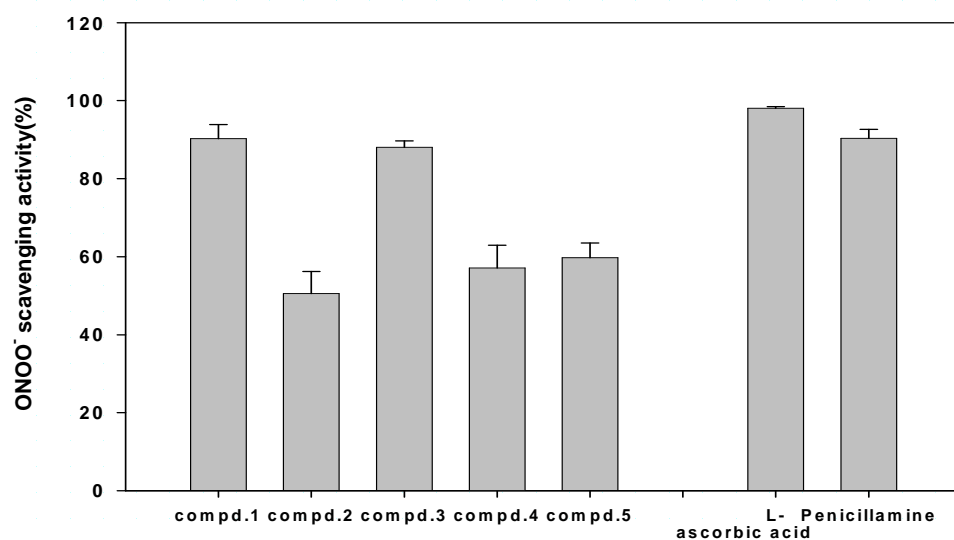


Fig. 55. Scavenging activity of *Sargassum thunbergii* compounds 1-5 on authentic ONOO⁻ (12.5 µg/ml). Each data is represented as the mean ± SEM of three experiments.

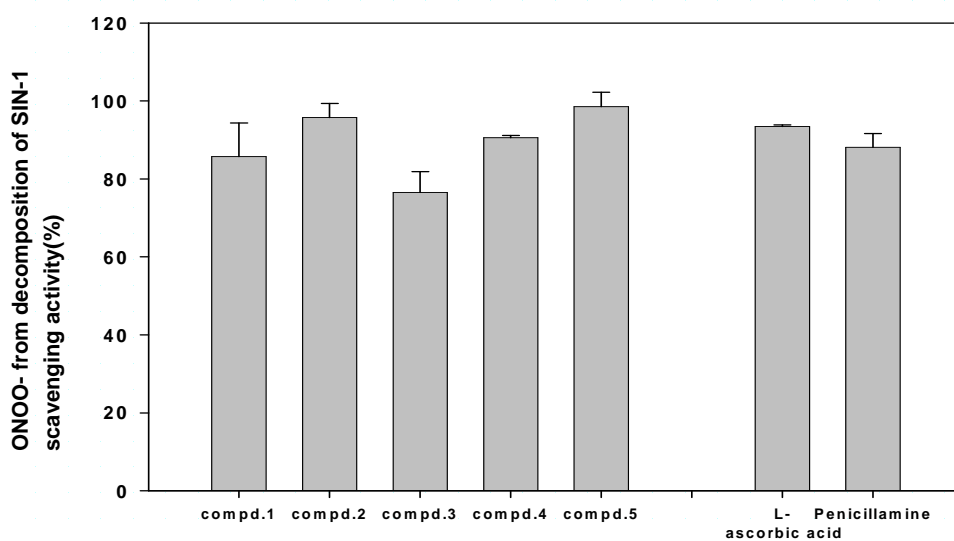


Fig. 56. Scavenging activity of *Sargassum thunbergii* compounds 1-5 on ONOO⁻ from decomposition of SIN-1 (12.5 µg/ml). Each data is represented as the mean ± SEM of three experiments.

4. 요약 및 결론

활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)과 활성 질소종 (reactive nitrogen species, RNS)에 의한 손상으로 인한 노화 진행은 신체 노화와 관련된 퇴행성 질환의 원인들 중 가장 합리적인 이론으로 알려져 있다. 본 연구에서는 부산연안에서 채집한 지충이를 추출, 분획 후 85% aq. MeOH fraction을 RP flash column chromatography 와 역상 HPLC 및 silica preparation TLC 로 분리하여 그 구조를 밝히고 효율적이고 안정한 새로운 항산화제임을 확인하기 위하여 in vitro 상에서 superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$)과 nitric oxide ($\text{NO}\cdot$)를 동시에 발생시키는 3-morpholinsydnonimine (SIN-1)와 authentic peroxynitrite (ONOO^-) 그리고 안정한 free radical로 알려져 있는 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)에 대한 소거 효과를 알아보았다. 지충이의 분획물인 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H_2O fraction을 assay한 결과 85% aq. MeOH fraction이 가장 탁월한 효과를 보였다. 따라서 85% aq. MeOH fraction으로부터 항산화 활성 물질 탐색을 시도하였고, 그 결과 분리실험을 한 결과 8개의 화합물 (1-8)을 결정하였으며, 그 구조는 ^1H COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC와 같은 2D NMR 실험으로 결정하였고, 신규물질 2개와 기지물질 6개임을 확인하였다. 분리한 화합물을 이용하여 항산화 실험을 한 결과, 분리한 화합물 (1-5)이 모두 우수한 효과를 보였으나, 특히 DPPH radical 소거 활성에서는 다섯 개의 화합물 모두 BHT의 IC_{50} 농도 $32\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 보다 우수한 효과를 보였으며, compound 1과 3은 각각 26, 27 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 L-ascorbic acid 의 11.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 보다는 능력이 떨어지지만 탁월한 항산화제임을 확인할 수 있다. 그리고 authentic ONOO^- 소거활성에서는 compound 1의 90.3%와 compound 3의 88.1%의 결과는 대조군으로 쓰인 강력한 항산화제인 L-ascorbic acid의 98.1%와 penicillamine의 90.4%의 결과만큼이나 뛰어남을 알 수 있다. SIN-1에 대해 특이적으로 활성

을 나타낸 화합물은 compound **5**가 98.6%의 효과로 가장 뚜렷한 결과를 보였고, compound **2** 또한 95.8%의 효과로 그 다음으로 좋은 결과를 보였다. 이는 대조군인 L-ascorbic acid의 93.5%와 penicillamine의 88.2%보다 좋은 결과임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 지충이가 우수한 항산화물질을 포함하고 있음을 확인해준다.

5. 참고문헌

- Patel, R. P., J. McAndrew, H. Sellak. C. R. White, H. Jo, B. A. Freeman, and V. M. Darley-USmar. 1999. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 385-400.
- Amico, V., G. Oriente, P. Nerl, M. Piattelli and G. Rubertom. 1987. Tetraprenyltoluquinols form the brown alga *Cystoseira stricta*. *Phytochemistry*. 26, 1715-1718.
- Davyt, D., W. Enz, E. Manta, G. Navarro and M. Norte. 1997. New chromenols form the brown alga *Desmarestia Menziesii*. *Natural Product Letters*. 9, 305-312.
- Kusumi, T., Y. Shibata, M. Ishitsuka, T. Kinoshita and H. Kakisawa. 1979. Structures of new plastoquinones from the brown alga *Sargassum seratifolium*. *Chemistry Letters. Chem. Lett.* 277-278.
- Numata, A., S. Kanbara, C. Takahashi, R. Fujiki, M. Younda, E. Fujita and Y. Nabeshima. 1991. Cytotoxic activity of marine algae and a cytotoxic principle of the brown alga *Sargassum tortile*. 30, 2129-2131.
- Numata, A., S., Kanbara, C. Takahashi, R. Fujiki, M. Yoneda, Y. Usami and E. Fujita. 1992. Cytotoxic principle of the brown alga *Sargassum tortile* and structure of chromenes. 31, *Chem . Pharm. Bull.* 1209-1213.
- Rivera, P., F. Podesta, M. Norte, F. Cataldo and A. G. Gonzalez. 1990. New plastoquinones from the brown alga *Desmarestia menziesii*. *Can. J. Chem.* 68, 1399-1409.
- Segawa, M. and H. Shirahama. 1997. New plastoquinones from the

- brown *Sargassum sagamianum* var. *yezoeses*. Chemistry Letters. 1365-1366.
- Seo, Y. J., Shin, H. J., Cha, Y.-A., Kim, J.-W. Ahn, B.-J. Lee and D. S Lee. 2003. A new monoterpene glucoside from *Portulaca oleracea*. Bull. Kor. Chem. Soc., 24, 1475-1477.
- Ali, M.S., M. Jahangir, M. Saleem, M.K. Pervez, S. Hameed, and V.U. Ahmad. 2000. Metabolites of marine algae collected from Karachi-coasts of Arabian Sea. *Natural Product Sciences*, 6(2), 61-65.
- Ancerewicz, J., E. Migliavacca, P.A. Carrupt, B. Testa, F. Bree, R. Zini, J.P. Tillenment, S. Labidalle, D. Guyot, A.M Chauvet-Monges, A. Crevat, and A.L. Riandt. 1998. structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 25(1), 113-120.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 25, 1199-1200.
- Chung, H.Y., H.R. Choi, H.J. Park, J.S. Choi, and W.C. Choi. 2001. Peroxynitrite scavenging and cytoprotective activity of 1,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether from the marine alga *Symphocladia latiuscula*. J. Agric. Food Chem., 49, 3614-3621.
- Hoppe, H.A. 1979. Marine algae in pharmaceutical science. Walter de Gruyter, Berlin-New York, 139.
- Kooy, N.W., J.A. Royall, H. Ischiropoulos, and J.S. Beckman. 1994. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology & Medicine*, 16, 149-156.

- Pryor, W. and G. Squadrito. 1995. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with the superoxide anion. *A. J. Physiol.*, 264, 699-722.
- Reiter, R.J., D.X. Tan, and S. Burkhardt. 2002. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline : amelioration with melatonin. *Mechanism of Aging and Development*. 123, 1007-1019.
- Ruperez, P. 2002. Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry*, 79, 23-26.
- Sanchez-Machado, D.I., J. Lopez-Cervantes, J. Lopez-Hernandez, and P. Paseiro-Losada. 2003. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chemistry*, 85(3), 439-444.
- Sandoval M., R.A. Ronzio, D.N. Muanza, D.A. Clark, and M.J.S. Miller. 1997. Peroxynitrite-induced apoptosis in epithelial(T84) and macrophage(RAW 264.7) cell lines : Effect of legume-derived polyphenols(phytolens) NITRIC OXIDE. *Biology and Chemistry*, 1(6), 476-483.
- Scheuer, P.J 1990. *Bioorganic Marine Chemistry*. Springer-Verlag, New York. 123 p.
- Thomson L., A. Denicola, and R. Radi. 2003. The trypanothione-thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 412, 55-65.
- Zhang, Q., Li, N., Liu, X., Zhao, Z., Li, Z and Xu, Z., 2004. The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its

- in vivo antioxidant activity. Carbohydrate Research, 330, in Press.
- Fridorich L. 1978. The biology of oxygen radicals. Science, 201, 875-881.
- Dreher, D. and F. Junod 1996. Role of oxygen free radicals in cancer development. European Journal of cancer, 32A(1), 3038.
- Benzie, I. F. F. 2000. Evoution of antioxidant defence mechanisms, European Journal of Nutrition 39, 53-61.